



Simão Freitas Félix

**Certificação de processos na área da biotecnologia
alimentar**



Simão Freitas Félix

Certificação de processos na área da biotecnologia alimentar

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, ramo de Biotecnologia alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Ana Xavier Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Nuno Azevedo da Biomode S.A.

o júri

Presidente

Prof. Doutora Luísa Alexandra Seuanes Serafim Martins Leal
professora associada da Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Ana Maria Rebelo Barreto Xavier
professora associada da Universidade de Aveiro

Doutor Nuno Filipe Ribeiro Pinto de Oliveira Azevedo
promotor da Biomode S.A.

Doutora Helena Isabel Pereira da Costa Aguilar Ribeiro
investigadora auxiliar da Faculdade de Engenharia da Universidade do Porto

Doutora Laura Isabel Macieira Cerqueira
promotora da Biomode S.A.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Professora Doutora Ana Xavier e Doutor Nuno Azevedo pela disponibilidade demonstrada.

Um especial agradecimento à Doutora Laura Cerqueira e Doutora Carina Almeida, pela paciência e disponibilidade demonstrada e por todas as críticas, sugestões e comentários sugeridos ao longo da orientação, imprescindíveis para a realização deste trabalho.

À empresa Biomode S.A. pela disponibilização de todo o equipamento e material necessário à realização de todo o trabalho em empresa. Um obrigado à Joana e Teresa por toda a disponibilidade demonstrada ao longo deste período.

À minha família e minha namorada por todo o apoio prestado durante a realização deste estágio.

palavras-chave

Listeria monocytogenes, *Salmonella* spp., PNA FISH, AOAC, ISO 9001

resumo

Os microrganismos que causam doenças de origem alimentar constituem um problema da sociedade atual. O desenvolvimento de métodos rápidos e eficientes para a deteção destes microrganismos é essencial. A empresa Biomode S.A. é uma startup com origem na Universidade do Minho que se dedica ao desenvolvimento e comercialização de métodos de diagnóstico molecular nas áreas clínica e agroalimentar.

A *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella* spp. inserem-se no grupo de microrganismos patogénicos transmitidos pelos alimentos. A Biomode S.A. desenvolveu um método de deteção baseado na técnica Híbridação *in situ* fluorescente com sondas de ácido peptídico nucleico (PNA FISH) para a deteção destes dois microrganismos patogénicos. Na primeira fase deste estágio o método de PNA FISH para a deteção de *L. monocytogenes* foi alvo de otimização, nomeadamente no passo de fixação que foi otimizado com etanol a 80% (v/v) e solução de lise. Usou-se uma sonda específica para a estirpe *L. monocytogenes* e uma sonda bloqueadora e as etapas de hibridação/lavagem foram efetuadas à temperatura de 57°C. A Biomode S.A. já tinha otimizado o método para a deteção de *Salmonella* spp., que se encontra na forma de um kit. No entanto antes da comercialização do mesmo foi necessário realizar a sua certificação. Na segunda fase deste estágio preparou-se a submissão do processo de certificação, pela AOAC (Association of Analytical Communities), iniciando a fase de consultadoria, assim como o tratamento de dados relativos ao estudo de mercado, ao nível dos métodos de deteção microbiológica na área alimentar. Na Biomode S.A. estava a decorrer o processo de implementação do Sistema de Gestão (SGQ) da Qualidade baseado na norma NP ISO 9001:2008. Este estágio, contribuiu para a implementação desta norma até aos processos relativos à produção.

keywords

Listeria monocytogenes, *Salmonella* spp., PNA FISH, AOAC, ISO 9001

abstract

The microorganisms that cause food-borne illness are a problem of modern society. The development of fast and efficient methods for the detection of these microorganisms is essential. The company Biomode S.A. is a startup with origin at the University of Minho dedicated to the development and commercialization of molecular diagnostic methods in both clinical and food. *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. fit into the group of pathogens transmitted by food. The Biomode S.A. developed a detection method based on the technique Peptide Nucleic Acid Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH PNA) for the detection of these two pathogens. The method PNA FISH for detection of *L. monocytogenes* was optimized, particularly in the fixing step that has been optimized with 80% (v/v) ethanol and lysis solution. A probe specific for the strain *L. monocytogenes* and a blocker probe was used for the detection and the steps of hybridization / washing was carried out at a temperature of 57° C. The Biomode SA has already optimized the PNA FISH method for the detection of *Salmonella* spp., which is in the form of a kit (Probe4Salmonella). However before the commercialization of Probe4Salmonella, it was necessary to conduct its certification. I was responsible for the preparation of submission of the certification process, by the AOAC (Association of Analytical Communities). It was initiated with consultation phase. As well as, the analysis and correlation of an online survey related to a market study in microbiological detection methods area. In Biomode S.A. was implementing a quality management system based on ISO 9001:2008. During my internship, the implementation of this rule was held up to the production process.

Índice

Introdução e objetivos-----	4
1. Microrganismos patogénicos transmitidos pelos alimentos-----	6
1.1 Introdução-----	6
1.2 <i>Salmonella</i> spp.-----	7
1.3 <i>Listeria monocytogenes</i> -----	8
1.4 Métodos de deteção de microrganismos-----	11
1.4.1 Métodos baseados em cultura-----	11
1.4.2 Métodos imunológicos-----	11
1.4.3 Métodos baseados em PCR-----	12
1.4.4 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente -----	13
1.4.4.1 Hibridação <i>in situ</i> fluorescente com sondas de ácido peptídico nucleico -----	17
2. Otimização do método de PNA-FISH para deteção de <i>Listeria monocytogenes</i> em amostras alimentares-----	19
2.1. Introdução-----	19
2.2. Materiais e métodos-----	19
2.3. Resultados e discussão-----	26
2.4. Conclusões e trabalhos futuros-----	34
3. Certificação do Probe4Salmonella pela AOAC-----	36
3.1 Enquadramento teórico-----	36
3.2 Etapas-----	37
3.3 Resultados e discussão-----	40
4. Inquérito no âmbito da análise do mercado da deteção microbiológica-----	43

4.1	Introdução-----	43
4.2	Respostas ao inquérito-----	43
4.3	Correlação dos resultados mais relevantes para Biomode, com a finalidade de uma melhor compreensão das necessidades do mercado.-----	50
5.	Certificação da empresa pela norma ISO 9001-----	53
5.1	Necessidade de certificação da empresa-----	53
5.2	Requisitos-----	60
5.3	Resultados e Discussão-----	60
6	Conclusão-----	65
	Bibliografia-----	67
	Anexo 1-----	73
	Consultant application-----	74
	Consultant agreement-----	77
	Data submission requirements-----	79
	Anexo 2-----	90
	Inquérito-----	91
	Respostas adicionais-----	94
	Tabelas com dados de correlações-----	99
	Anexo 3-----	102
	Objetivos de qualidade-----	103
	Anexo 4-----	104
	Dossiê de lote-----	105
	Anexo 5-----	106

Fichas MSDS-----	107
Anexo 6-----	154
Certificados de qualidade-----	155
Anexo 7-----	159
Manual de produção-----	160
Anexo 8-----	164
Etiquetas-----	165
Anexo 9-----	166
Folheto informativo-----	167

Introdução e Objetivos

A Biomode–Biomolecular Determination, S.A é uma empresa que pretende comercializar a curto prazo, produtos baseados na tecnologia de Hibridação *in situ* fluorescente com sondas de ácido peptídico nucleico (PNA FISH) para a identificação/deteção de microrganismos patogénicos em amostras clínicas e alimentares. Presentemente a BioMode, S.A. tem já um portfólio de vários produtos a serem desenvolvidos, patenteados, certificados e preparados para a entrada no mercado.

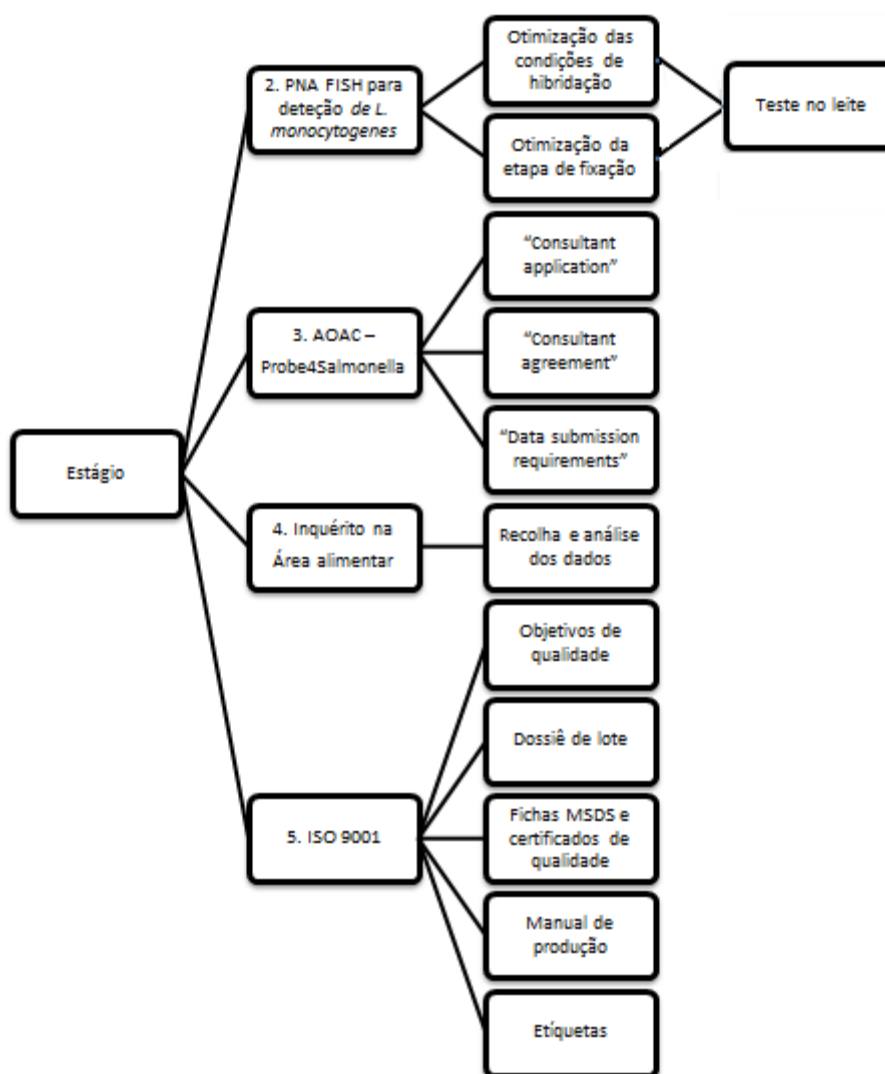


Figura 1: Organograma dos trabalhos realizados na Biomode S.A.

Após introdução teórica, a tese está organizada em 4 outros capítulos (Figura 1), nos quais são abordados aspetos inerentes ao objectivo do trabalho na empresa Biomode S.A.. O primeiro objetivo deste trabalho passou pela otimização do método de PNA FISH para deteção de *Listeria monocytogenes* em amostras alimentares (leite) (Capítulo

2). Simultaneamente, foi preparada a submissão do processo de certificação, pela “Association of Analytical Communities” (AOAC), relativa ao kit de detecção rápida de *Salmonella* spp. (Probe4Salmonella®), que será o primeiro produto da Biomode, S.A. (Capítulo 3). Foi também efetuado um estudo de mercado sob a forma de inquérito *online*. Este visa obter informação para a facilitação da entrada do produto no mercado e será uma ferramenta importante para o desenvolvimento do plano de negócios para a apresentação a futuros investidores (Capítulo 4). Por outro lado, uma vez que a implementação da norma ISO 9001 na empresa estava a decorrer (Capítulo 5), foram redigidos vários documentos associados a esta certificação e foi organizado o dossier do manual de qualidade.

Capítulo 1- Microrganismos patogénicos transmitidos pelos alimentos

1.1 Introdução

As doenças de origem alimentar continuam a ser um flagelo para a sociedade atual. Tem havido um enorme esforço para melhorar a eficácia da segurança alimentar e, consequentemente cresce a preocupação por parte dos fabricantes e processadores alimentares para assegurar a diminuição dos riscos associados a doenças de origem alimentar [1]. Os consumidores nos países desenvolvidos esperam que a sua comida seja completamente segura, e que haja uma total eliminação de vírus e bactérias patogénicas. Globalmente, milhares de milhões de refeições são consumidas por dia em ambientes onde potencialmente há a presença de microrganismos patogénicos. Isto deve-se não só ao manuseamento indevido dos alimentos, como à presença de ingredientes contaminados [1]. Estima-se que as doenças de origem alimentar rondem os 76 milhões de casos, ocorrendo cerca de 325000 hospitalizações e 5000 mortes nos Estados Unidos em cada ano [2]. A nível da União Europeia ocorreram 12409 casos, 1422 hospitalizações e 15 mortes devido aos mesmos problemas, em 2010 [3]. Assim identificam-se 5 fatores como os principais responsáveis pelas doenças de origem alimentar: procedimentos inapropriados a cozinhar, temperatura de armazenamento desadequada, falta de higiene por parte de quem lida com os alimentos, contaminações cruzadas entre alimentos crus e frescos em comidas prontas-a-comer e a aquisição de alimentos de fontes pouco fiáveis [4].

A zoonose é uma infeção ou doença que pode ser transmitida directa ou indiretamente entre animais e humanos. Contaminações com *Salmonella* spp. *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* são os principais causadores deste síndrome. Os dois primeiros microrganismos evidenciam-se, pois em 2010 das 15 mortes ocorridas na União Europeia, 9 foram da responsabilidade da *Salmonella* spp. e 4 da *L. monocytogenes* [3]. Contudo este flagelo não será o único responsável pelas doenças de origem alimentar. Outros alimentos, como os de origem vegetal, também estão sujeitos a contaminações por estes mesmos agentes e consequentemente causam doenças transmitidas pelo consumo de alimentos.

1.2 *Salmonella* spp.

A *Salmonella* spp. é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa e não formadora de esporos. A maioria das suas estirpes tem mobilidade, devido à presença de flagelos [5]. Esta bactéria é mesófila, com uma temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C. No entanto, a sua gama de crescimento vai desde os 5°C até aos 46°C. A *Salmonella* spp. é destruída pelo processo de pasteurização, e é sensível a um pH ácido (4,5 ou inferior). Não se reproduz perante uma atividade de água inferior ou igual a 0,94, especialmente quando este fator é combinado com um pH de 5.5 ou inferior [6]. É capaz de sobreviver a temperaturas de congelamento e em ambientes secos durante muito tempo. Esta bactéria consegue multiplicar-se sem afetar as qualidades organoléticas dos alimentos. A *Salmonella* spp. tem ainda a habilidade de sobreviver em ambientes de altas concentrações de sal [7]. Existem duas espécies de *Salmonella*: *S. enterica* e *S. bongori*. A primeira foi classificada em 6 subespécies: *S. enterica* subsp. *enterica*, *S. enterica* subsp. *salamae*, *S. enterica* subsp. *arizonae*, *S. enterica* subsp. *diarizonae*, *S. enterica* subsp. *houtenae* e *S. enterica* subsp. *indica*. Porém, a segunda não possui subespécies [8]. Existem mais de 2500 serotipos considerados como potencialmente patogénicos em humanos. Estes serotipos são divididos em serogrupos de acordo com os fatores antigénicos comuns. A *Salmonella* spp. possui uma estrutura complexa de lipopolissacarídeos. O número de repetições de unidades e a composição dos açúcares variam consideravelmente nos lipopolissacarídeos da *Salmonella* spp. e são vitais para estudos epidemiológicos. Os açúcares são antigénios e portanto podem ser utilizados imunologicamente para a identificação de *Salmonella* spp. [5].

A Salmonelose é uma doença transmitida pelos alimentos contaminados, causada pela exposição a *Salmonella* spp.. Esta doença continua a ser uma ameaça grave para a saúde pública, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento. As fases etárias dos 0-4 e 5-14 anos são as mais suscetíveis à salmonelose e há um pico sazonal correspondente ao fim do verão e início do outono na Europa [3]. Os vários tipos de carne e os seus derivados estão mais sujeitos a contaminação pela *Salmonella* spp.. Os alimentos mais suscetíveis são carne de frango fresca e carne de peru fresca, com níveis médios de incidência de 4,8% e 9,0% respetivamente. *Salmonella* spp. provoca dois tipos de síndromes, descritos simplesmente como doenças sistémicas e gastroenterites. Em países desenvolvidos as gastroenterites estão frequentemente associadas a doenças transmitidas por alimentos

[9]. O custo estimado para o sistema de saúde pública e para a perda de produção na União Europeia é de 3 bilhões de euros por ano. A salmonelose é a segunda zoonose mais reportada na União Europeia, com 99020 casos confirmados em 2010, apesar de representar uma diminuição em relação a anos anteriores, como é evidenciado na Figura 2. Em 2010 apresentou uma gama de fatalidade a rondar os 0,13%. Os serotipos associados mais reportados em casos humanos foram *S. enteritidis* e *S. typhimurium*, com uma incidência de 45,0% e 22,4 % respetivamente. Contudo, vários países europeus apresentam uma tendência significativamente crescente, mostrando que continuam a ser necessários esforços neste âmbito ao nível da prevenção e controlo [3].

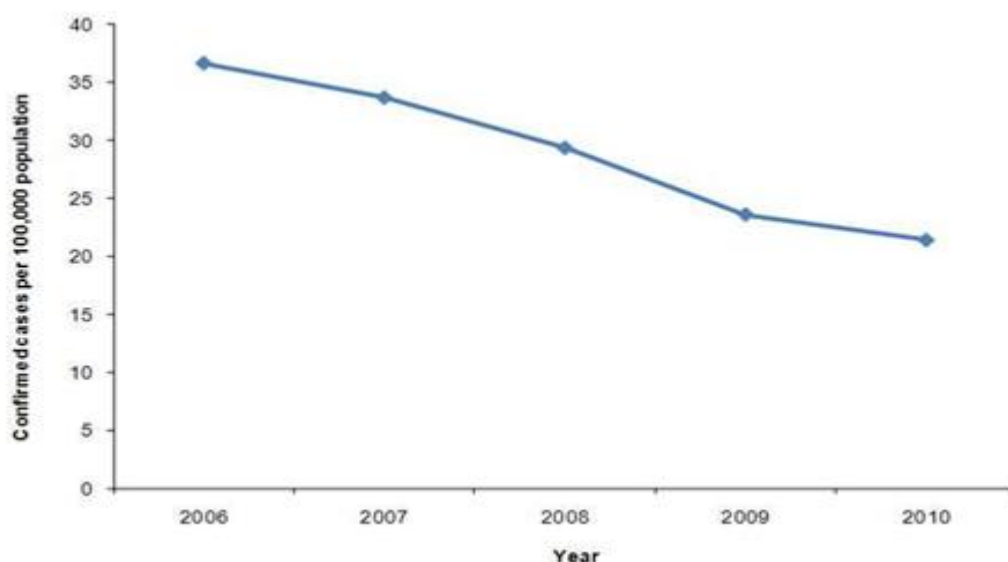


Figura 2: Casos reportados de salmonelose na União Europeia de 2006-2010 [3].

1.3-*Listeria monocytogenes*

O género *Listeria* é representado por 7 espécies: *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* and *L. Marthii* onde apenas a primeira é patogénica para humanos [10]. A *Listeria monocytogenes* é uma bactéria Gram-positiva, anaeróbica facultativa e não formadora de esporos. Apresenta uma forma de bastonete e é móvel à temperatura ambiente, pois possui flagelos peritricosos (em toda a superfície da parede celular). A *L. monocytogenes* é uma espécie psicotrófica (sobrevive a baixas temperaturas), logo torna-se uma séria ameaça para a indústria alimentar. Ela consegue sobreviver na maioria das condições de stress inerentes ao processamento alimentar, tais como alta salinidade, temperaturas de refrigeração (abaixo dos 0°C),

gama de pH entre 4,6 e 9,5 e com um valor de atividade de água de 0,92 [11]. Assim, esta bactéria encontra condições favoráveis para o crescimento dentro dos equipamentos da indústria alimentar, nomeadamente no ambiente frio e húmido de salas refrigeradas. Contudo, ela não consegue sobreviver às temperaturas de pasteurização.

A *L. monocytogenes* é patogénica para humanos causando listeriose. Apesar de a *L. monocytogenes* ser identificada como patogénica, apenas na década de 80 começaram a ser documentados casos de listeriose devido ao consumo de alimentos contaminados [12]. Contudo, também há registo de casos raros de doenças provocadas por *L. ivanovii* e *L. seeligeri* [13]. As manifestações primárias de listeriose em humanos incluem septicemia, meningite (ou meningoencefalite) e encefalite, geralmente precedidos por sintomas de gripe, incluindo febre. Também podem ocorrer manifestações gastrointestinais com febre. A mortalidade relacionada com casos de listeriose pode atingir valores da ordem de 30%. Em grávidas, a infeção pode resultar em morte fetal, aborto ou parto prematuro [14].

Apesar da exposição à bactéria ser comum, a listeriose é rara ao nível da população em geral. Na Europa a incidência da mesma varia entre 0,3 e 7,5 casos por milhão de habitantes com uma mortalidade entre 20 a 30%, apesar de esta doença ser facilmente tratada, com recurso a antibióticos [15]. Em Portugal, a listeriose não é uma infeção notificada, consequentemente os dados sobre a mesma são escassos [16]. O número de casos de listeriose na União Europeia, nos últimos anos, pode ser observado na Figura 3.

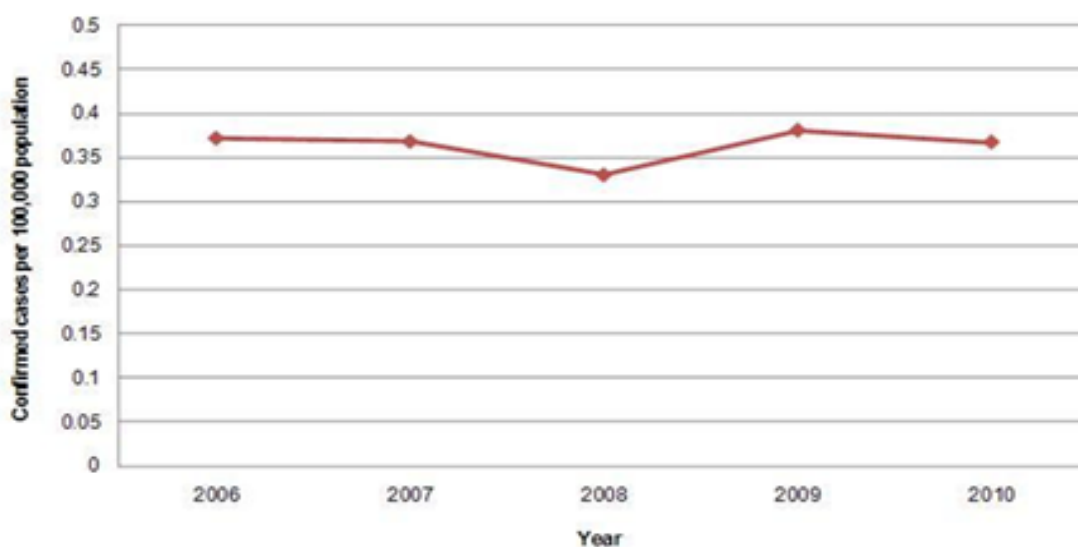


Figura 3: Casos reportados de listeriose por 100000 habitantes de 2006 a 2010, na União Europeia [3].

A listeriose é considerada um dos agentes mais importantes na causa das doenças de origem alimentar. Explicações possíveis para a emergência deste problema de saúde pública passam pelas grandes mudanças na produção, processamento e distribuição alimentar, com o aumento do uso da refrigeração como técnica primária de conservação dos alimentos. As mudanças nos hábitos alimentares, particularmente no consumo de comida pronta a comer e o aumento do número de pessoas consideradas de alto risco (idosos, mulheres grávidas, recém-nascidos, imunocomprometidos) também contribuem para o aumento deste problema [14, 17].

Uma vasta gama de alimentos, incluindo leite, queijos, gelados, carnes e várias comidas prontas-a-comer aparece como facilmente passível de contaminação com *L. monocytogenes* [18]. A dose mínima de bactéria no alimento, a partir da qual poderá dar origem a listeriose, pode ser de pelo menos 100 cfu/g de comida [19]. A maioria dos países tem uma política de tolerância zero tendo a *L. monocytogenes*, como é o caso dos Estados Unidos [18]. Então, é necessário que os produtores alimentares possuam meios rápidos para detetar baixos níveis de microrganismos patogénicos, a fim de evitar repercussões legais e os elevados custos associados.

1.4 Métodos de deteção de microrganismos

As doenças de origem alimentar revelam, no campo da deteção de microrganismos, uma possibilidade de inovação. O método ótimo para a deteção de microrganismos deve ser simples de realizar, sensível para o limite de deteção em causa, específico para as espécies patogénicas dentro do género. Por exemplo, e como referido acima, a *Listeria* spp. possui 7 espécies e apenas a espécie *L. monocytogenes* afecta os humanos. Além disso, o método deve ser rápido e não dispendioso, fornecendo resultados em menos de um dia e deve ser passível de automatização [20]. Existem varias técnicas para a deteção de microrganismos, das quais se destacam os métodos baseados em cultura, técnicas imunológicas, técnicas baseadas em PCR e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH). Todas estas se aplicam à deteção de *L. monocytogenes* e *Salmonella* spp..

1.4.1 Técnicas baseadas em cultura

As técnicas baseadas em culturas são os métodos tradicionais para a deteção de microrganismos e continuam a ser uma técnica fiável e precisa [21-23]. Estas técnicas

apresentam uma alta sensibilidade e especificidade [24]. Contudo este método tem associado enormes desvantagens. É um método bastante trabalhoso e requer a seleção aleatória do número de colónias obtidas de uma amostra [25]. Outra desvantagem associada a este método é a excessiva confiança no fenótipo, pois este está sujeito a mudanças em diferentes condições ambientais. Além disto, há necessidade de diferentes meios e reagentes químicos. Existe também o problema das contaminações, que podem mascarar a presença do organismo que se pretende identificar e as reações atípicas geradas por estirpes atípicas [26].

1.4.2 Técnicas baseadas em métodos imunológicos

A especificidade da reação antígeno - anticorpo permite a detecção de microrganismos patogénicos. Os anticorpos podem ser usados para detecção de células inteiras ou componentes celulares específicos. Contudo, estes métodos também apresentam desvantagens, tais como a menor sensibilidade, comparado com técnicas baseadas em amplificação de ácidos nucleicos, possuindo menores limites de detecção, que são da ordem de 10^5 cel/mL para uma amostra enriquecida na detecção de *L. monocytogenes* [24]. Pode ainda acontecer reatividade cruzada com espécies parecidas, afetando a sensibilidade do método [27]. A preparação de anticorpos é muito mais demorada que a preparação de primers/sondas e a produção de anticorpos tem que ser testada exaustivamente devido à sua baixa sensibilidade e especificidade, pois anticorpos produzidos por diferentes animais diferem na sua eficiência. Durante o processo pode ocorrer a perda da molécula alvo. Como exemplos de técnicas imunológicas destacam-se o teste ELISA e a separação imunomagnética (IMS).

1.4.3 Métodos baseados em PCR

Técnicas de cultura convencionais e os métodos baseados em imunologia têm a desvantagem comum de serem muito demorados e com a possibilidade de haver falsos-positivos (indica a presença de um microrganismo, quando na realidade este não está presente). Tanto Zhang *et al.* (2010), como Frece *et al.* (2009) [25, 28] sugerem a utilização de métodos com base genética em detrimento dos métodos baseados no fenótipo, com a finalidade de aumentar a confiança e sensibilidade. O PCR insere-se na gama de técnicas de detecção molecular de ácidos nucleicos, sendo um método que produz múltiplas cópias do DNA alvo. Este método emprega diferentes ciclos de temperatura (no PCR mais comum utilizam-se 3 diferentes temperaturas). A primeira

para quebrar a cadeia dupla do DNA, geralmente a mais elevada (superior a 90°C). Posteriormente, a uma temperatura inferior efetua-se o *annealing* onde se realiza a ligação dos primers à sequência alvo. Por último, a DNA polimerase sintetiza a cópia do DNA alvo, a uma temperatura intermédia das anteriores. Este ciclo de temperaturas é repetido várias vezes. Os segmentos de DNA podem ser detetados usando electroforese em gel de agarose, seguida de visualização UV com a utilização do brometo de etídio, ou o gelred (não cancerígeno), entre outros. O procedimento do PCR demora algumas horas, e é mais sensível que as técnicas baseadas em culturas [29, 30]. O PCR resolve o problema de certas células em alguns meios não crescerem, (problema associado aos métodos baseados em cultura). Tem um limite de deteção de 10⁰ cfu por 25 g de alimento para a deteção de *L. monocytogenes* [31]. Contudo, esta técnica não consegue distinguir DNA de células vivas ou mortas [32]. Além disso a deteção de *L. monocytogenes* em amostras alimentares é difícil devido ao seu pequeno número de células [29]. As diferentes técnicas baseadas em ácidos nucleicos para a deteção de *L. monocytogenes* estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1: Comparação das técnicas baseadas em ácidos nucleicos para a deteção de *L. monocytogenes*.

Método de deteção	Tempo total da deteção (h)	Número de células detectadas	Meio onde são detetados	Referência
PCR	58-60	2–8 cfu/25 g	Salmão	[33]
	Não disponível	10 ⁵ cfu/mL	Cultura pura	[34]
	24	10 cfu/25 g	Salsichão	[34]
	~100	Não disponível	Salmão fumado	[35, 36]
	~45	20–200 cel/25 mL	Leite	[37]
BAX®PCR	80	0.5–3 cfu/25 g	Salsichão queijo de pasta mole, salmão defumado, carne moída, rabanetes, ervilhas congeladas	[38]
PCR competitivo	5	10 ³ cfu/0.5 mL	Leite	[39]
	20	1 cfu/0.5 mL	Leite	[39]
PCR com sonda de DNA	24	2–10 cel/g	Leite e vários produtos de carne	[20]

FRET-PCR	2.5	500 cfu/mL	Cultura pura	[40]
	2.5	10^3 – 10^4 cfu/mL	Leite desnatado	[40]
PCR em tempo real	1	15 cfu	Cultura pura	[41, 42]
	30	10^2 – 10^3 cfu/mL	Cultura pura	[43]
	8	10^8 – 10^{10} cfu/25 g	Repolho	[44]
PCR multiplex com classificação de microesfera	4	10^3 – 10^5 Cópias de genoma	Cultura pura	[45]
DNA Microarray	Não disponível	Não disponível	Cultura pura	[46]
RT-PCR	55	10–15 cfu/mL	Cultura pura	[47]
	54	3 cfu/g	Carne moída	[47]

O PCR resolve alguns dos problemas relacionados com resultados falso-positivos reportados nas técnicas baseadas em cultura [29, 30].

1.4.4 Hibridação *in situ* fluorescente

Perante a utilização de métodos bastante trabalhosos e demorados surge a necessidade de uma rápida deteção de microrganismos patogénicos (no espaço de 1 dia de trabalho nas indústrias alimentares) e com uma alta sensibilidade (grande desvantagem dos métodos imunológicos) [48].

A técnica de hibridação *in situ* fluorescente (FISH) deteta sequências nucleotídicas alvo do rRNA. A sonda hibrida especificamente na sequência alvo dentro da célula intacta, emitindo fluorescência devido a esta possuir um fluorocromo acoplado. Esta técnica é aplicada em várias áreas que vão desde os diagnósticos clínicos [49], a análises filogenéticas, ecológicas e ambientais em microbiologia [15, 50].

Nesta técnica são usadas, frequentemente, sondas que identificam a sequência de 16S do RNA ribossomal no reino Bactéria ou Archea, ou 18S rRNA de eucariotas. Porém também podem ser utilizadas para identificar sequências 23S e 28S. A técnica não necessita de uma cultura prévia de células (passo de enriquecimento). Não ocorrem

alterações morfológicas nem alterações na integridade celular com a aplicação da mesma. Esta técnica divide-se em 4 etapas, a fixação, hibridação, lavagem e a detecção, como é ilustrada na Figura 4.

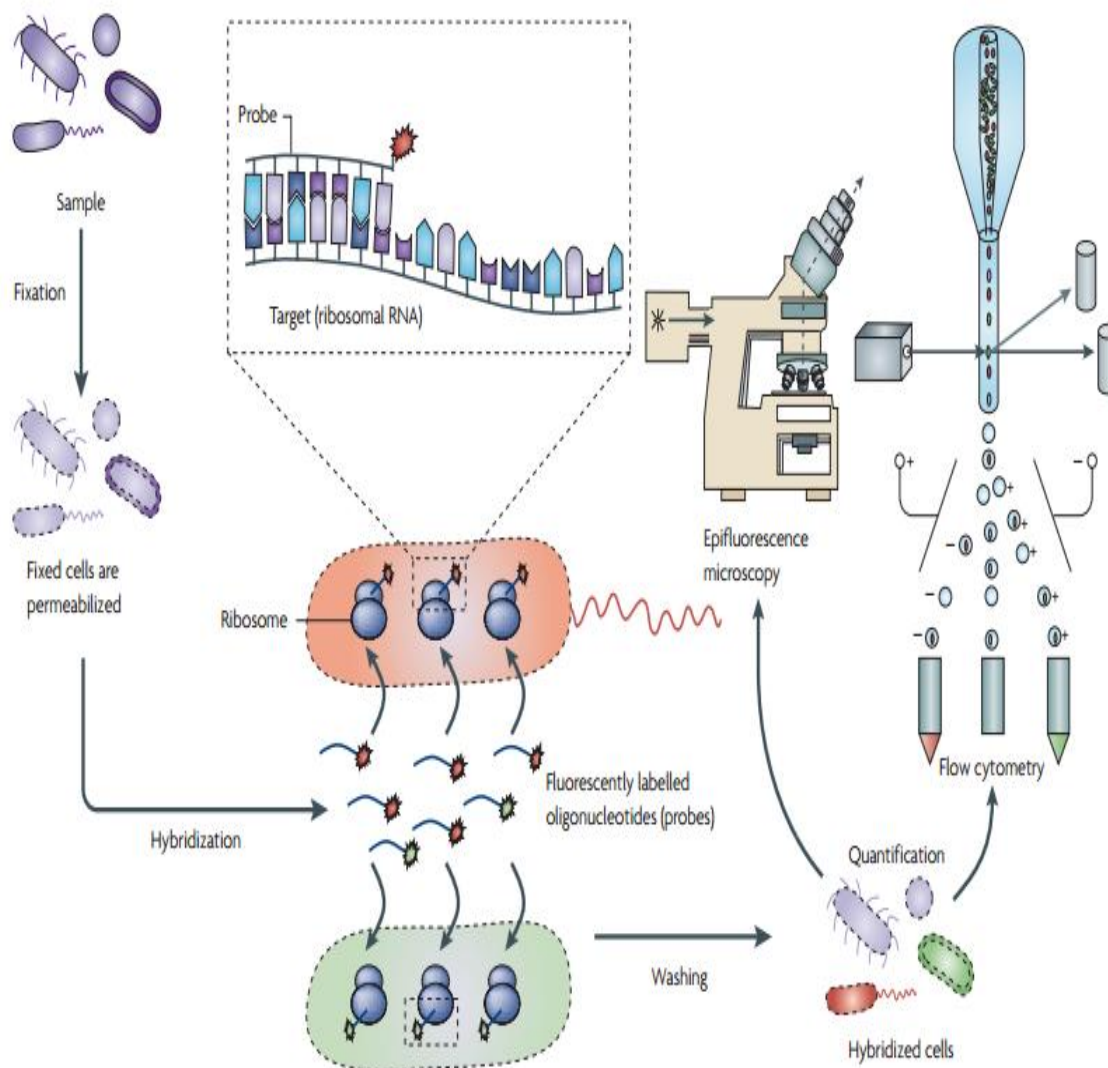


Figura 4: Etapas base da técnica FISH [51].

Numa primeira fase, a bactéria tem que ser fixada e permeabilizada para poder ocorrer a penetração da sonda na célula, assim como a proteção contra RNAses endógenas. Nesta etapa de fixação, podem ser usados agentes precipitantes como etanol, metanol e agentes *cross-linking*, como aldeídos, ou uma mistura dos mesmos. As condições de fixação podem variar dependendo do organismo alvo, do tipo de amostra e tecido. Uma fixação eficaz é fulcral para os resultados de FISH, contudo esta etapa é difícil de otimizar. Uma fixação ideal deve resultar numa boa penetração da sonda,

retenção do nível máximo de RNA alvo, e a manutenção da integridade celular e detalhe morfológico [49]. Numa segunda fase ocorre a hibridação, que tem de ser efetuada dentro de condições rigorosas para que ocorra a ligação eficaz entre a sonda e a sequência alvo. A otimização da hibridação pode ser ajustada variando quer a concentração de formamida quer a temperatura de hibridação. A formamida enfraquece as ligações de hidrogénio, diminuindo assim a temperatura de fusão. Assim consegue-se a utilização de temperaturas mais baixas para a hibridação. Esta ocorre num local escuro e húmido, variando entre 30 minutos e algumas horas. A temperatura de hibridação varia entre os 40°C e os 60°C [52]. De seguida torna-se necessário realizar uma lavagem para assegurar que todas as sondas não ligadas ou com fraca ligação sejam removidas. Assim confere-se especificidade à deteção [53]. Este passo é difícil de otimizar, mas é muito importante para minimizar os resultados falso-positivos de sondas não ligadas. A lavagem geralmente ocorre à mesma gama de temperaturas que a hibridação. Podem ser utilizados detergentes como SDS, Triton-X, ou Tween [15]. Após a realização destas 3 fases decorre a deteção, onde as amostras são analisadas quer por microscopia de fluorescência quer por citometria de fluxo [52]. A primeira técnica tem a vantagem de ser mais rápida e simples, contudo é necessário pessoal treinado para não haver uma incorreta interpretação dos resultados, devido ao carácter qualitativo que este instrumento confere. A segunda técnica fornece uma análise quantitativa dos resultados, contudo o equipamento necessário é bastante dispendioso [49].

Na técnica de FISH, tradicionalmente a hibridação é realizada com sondas de moléculas de DNA. A utilização destas sondas tem desvantagens inerentes, tais como a dificuldade de permeabilidade celular, pois nem sempre as membranas celulares são permeáveis (devido ao tamanho das sondas), logo é muitas vezes necessário um pré tratamento com enzimas proteolíticas principalmente em bactérias Gram positivas [52, 54]. O acesso ao rRNA pode levar a que a fase de hibridação dure até 96 horas, devido a estrutura secundária do rRNA [55]. O método não tem a habilidade de discriminar sequências com apenas uma base de diferença, afetando a especificidade [56]. A sonda está sujeita a degradação por proteases e endonucleases celulares, por ser uma molécula natural de DNA [57, 58]. Usualmente as moléculas alvo são moléculas de RNA ribossomal que são os elementos funcionais e estruturais chave das células e são altamente conservados entre espécies próximas. Os rRNA estão presentes num elevado número de cópias em bactérias. Vários estudos concluíram que o nível de sinal

fluorescente está dependente da escolha da região alvo da sonda. Esta variabilidade tem sido atribuída à fraca acessibilidade das sondas de DNA ao rRNA alvo devido à alta estabilidade da sua estrutura secundária [53].

Adicionalmente a técnica de FISH, principalmente com o uso de moléculas naturais de DNA, pode apresentar resultados falsos positivos e resultados falsos negativos. Os primeiros podem dever-se a autofluorescência [59, 60] e déficit de especificidade da sonda [61]. Os segundos podem ocorrer devido a uma insuficiente penetração da sonda, dificuldade de acesso à sequência de RNA alvo (devido à sua estrutura tridimensional) [61], baixa quantidade de RNA [62] e fotodegradação [49].

1.4.4.1 PNA FISH

Para combater todas estas desvantagens, a utilização de sondas análogas de ácidos nucleicos, como “peptide nucleic acid” (PNA) e “locked nucleic acid” (LNA) entre outras [53], tem sido bastante aceite pela comunidade científica. Inicialmente foram exploradas para a regulação génica, porém estas têm uma vasta gama de aplicações em FISH. Estas moléculas, devido à sua natureza sintética, são resistentes a ataques enzimáticos e possuem maior afinidade para sequências de RNA, com baixo número de pares de bases, comparativamente às sondas de DNA. O uso de sondas de PNA vem resolver as dificuldades de penetração da sonda na célula bacteriana.

Na sonda de PNA, a carga negativa do açúcar fosfatado da cadeia de DNA é substituída por uma cadeia poliamida neutra composta por unidades N-(2-aminoetil) glicina [20], como pode ser observado na figura 5.

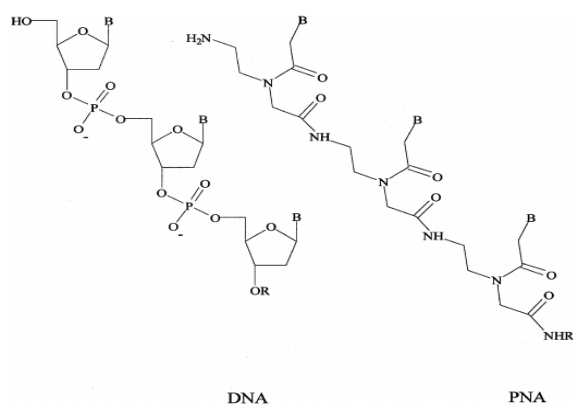


Figura 5: Comparação das moléculas de DNA e PNA [63].

Devido à configuração química do PNA, as bases nucleicas são posicionadas praticamente na mesma posição e com a mesma distância que no DNA natural. Consequentemente, as moléculas de PNA conseguem hibridar com DNA e RNA [64, 65]. O déficit de repulsão eletrostática, devido a não ter carga, leva a melhor estabilidade térmica comparada com dupletos de DNA/DNA o que implica que a temperatura de fusão para dupletos de PNA/DNA seja maior do que para DNA/DNA [65, 66]. O aumento da temperatura de fusão é útil para síntese de sondas de PNA mais pequenas que a maioria das sondas de DNA (aproximadamente 15 pb para sondas de PNA em contraste com cerca de 24 pb para as sondas de DNA). Assim as sondas de PNA têm maior especificidade para a detecção de sequências de DNA comparativamente às sondas de DNA [67]. As moléculas de PNA hibridam em baixa concentração de sal [68], permitindo total acesso à sequência de rRNA. Estas condições promovem instabilidade na estrutura secundária do RNA ribossomal resultando num melhoramento no acesso às sequências desejadas comparativamente com o convencional FISH [55, 69, 70]. Tal como outras moléculas sintéticas, o PNA apresenta resistência a nucleases e proteases [54, 71, 72]. A uniformização do método de PNA- FISH aumenta a possibilidade da identificação simultânea de diferentes microrganismos (identificação múltipla) usando sondas de PNA com diferentes fluorocromos [66]. Contudo os elevados preços associados a esta técnica estão a atrasar a aplicação do PNA FISH [15].

A técnica de PNA FISH segue o procedimento aplicado em técnicas de FISH, com alteração da natureza da sonda. Para as sondas de PNA FISH utiliza-se normalmente uma temperatura de hibridação superior pois as sondas geralmente também apresentam uma temperatura de fusão maior [64]. Usando uma temperatura maior ocorre uma melhor perturbação das estruturas alvo, melhorando a especificidade da sonda. Na lavagem são necessárias condições mais rigorosas do que com as sondas de DNA [52].

O uso de FISH com sondas de PNA tem-se tornado uma técnica bastante usada para a detecção de uma vasta gama de microrganismos. Wilks e Keevil (2006) aplicaram o PNA FISH para a detecção de *Legionella pneumophila* usando uma gama de temperatura de hibridação entre 55° e 65°C e 30% de formamida obtendo uma especificidade de 92% e sensibilidade de 100% [73]. Almeida *et al.* (2010) aplicaram o mesmo método para a detecção de *Salmonella* spp., alcançando uma especificidade e sensibilidade de 100% com 30% de formamida, a uma temperatura de hibridação de 57°

C [74]. Ao nível da deteção do género *Listeria*, Brehm-Stecher *et al.* (2005), aplicaram o mesmo método obtendo uma especificidade e eficiência de 97%, com uma temperatura de hibridação de 55°C, com 0,5% SDS [75].

Capítulo 2- Otimização do método de PNA FISH para detecção de *Listeria monocytogenes* em amostras alimentares

2.1 Introdução

A Biomode S.A. pretendeu desenvolver um método de detecção da *L. monocytogenes*, baseado na técnica PNA FISH. Em trabalhos anteriormente realizados já se tinha desenhado a sonda, e feita a sua síntese (PANAGENE, Coreia do Sul) [76]. Neste trabalho, fez-se a otimização da técnica de PNA FISH aplicada à detecção da *L. monocytogenes*. Esta técnica baseia-se em 4 etapas: Fixação, Hibridação, Lavagem e Detecção. As primeiras 3 etapas podem ser alvo de otimização para que exista uma boa penetração da sonda, retenção do nível máximo de RNA alvo, e a manutenção da integridade celular e detalhe morfológico (Fixação) [49]. Para tal, são necessárias condições rigorosas para que se efetue uma ligação eficaz entre a sonda e a sequência alvo (Hibridação), assim como a eficaz remoção das sondas não ligadas ou com fraca ligação (Lavagem) [53].

Inicialmente, foi efetuada a otimização das condições de hibridação e lavagem, testando várias gamas de temperatura a que estas etapas poderão ser realizadas. No entanto, pelo facto de haver resultados falso-positivos, foi também testada a possibilidade de utilização de uma sonda bloqueadora. Adicionalmente, também foram optimizadas as condições de fixação, tendo sido testados vários agentes de fixação, como triton X, metanol, solução de lise entre outros. Após ter-se concluído a optimização das condições, realizou-se um ensaio para a detecção de *L. monocytogenes* em amostras de leite contaminado com concentrações definidas deste microrganismo. Ao longo deste trabalho foram testados os diferentes parâmetros da técnica PNA FISH: especificidade, sensibilidade, limite de detecção e a comparação com o método de cultura para a detecção de *L. monocytogenes*. Os diferentes procedimentos encontram-se descritos abaixo.

2.2 Materiais e Métodos

-Cultura das estirpes usadas

As estirpes de *Listeria* spp utilizadas neste estudo encontram-se descritas na Tabela 6. Todas as estirpes foram crescidas em placas de Brain Heart Infusion (BHI) (Liofilchem S.r.l., Italia) a 37°C e repicados em placas frescas a cada 24 horas.

-Preparação dos reagentes necessários às experiências:

Solução de Hibridação

Os compostos necessários à preparação da solução de hibridação, assim como as concentrações e respectivas quantidades para a preparação de 10 ml de solução, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 – Composição da Solução de Hibridação. Concentração dos diferentes reagentes e respectivas quantidades utilizadas na preparação de 10 ml de solução (todos os compostos são provenientes da empresa Sigma-aldrich, Espanha).

Compostos e concentração respectiva na solução	Quantidade para 10,0 ml de solução
10% (m/v) Sulfato de dextrano	1,00 g
10 mM NaCl	0,0058 g
30% (v/v) Formamida	3,0 ml
0,1% (m/v) Pirofosfato de sódio	0,010 g
0,2% (m/v) Polivinilpirrolina	0,020 g
0,2% (m/v) FICOLL	0,020 g
5 mM Disodium EDTA	0,020 g
0,1% (v/v) Triton X-100	0,0010 ml
50 mM Tris-HCl	0,079 g

Após a dissolução de todos os reagentes, fez-se o volume final com água esterilizada e acertou-se o pH a 7,5.

Filtrou-se a solução com um acrodisco de porosidade 0,2 μ m e guardou-se a solução a 4°C.

Preparação da sonda para adicionar à solução de hibridação

-Alíquota original

A sonda foi comprada em pó (Panagene, Coreia do Sul) e a sua preparação consistiu em adicionar ao liofilizado, uma solução composta por 1% (v/v) de ácido fluoroacético e 10% (v/v) de acetonitrilo, sendo a concentração final da alíquota original de 100 μ M. Trabalhou-se com dois tipos de alíquotas originais, uma referente à sonda Lis 594 e

outra à sonda bloqueadora. As sondas foram armazenadas no congelador a -20 °C envolvidas em papel de alumínio.

- A alíquota de stock

A alíquota de stock (4 µM) foi preparada adicionando 40 µL da solução da alíquota original (100 µM) em 960 µL de água ultra pura. As alíquotas de stock também foram guardadas a -20 °C envoltas em papel de alumínio. Foi necessário preparar duas alíquotas de stock, uma referente à sonda, outra referente à sonda bloqueadora.

- Alíquota de uso

Quanto à alíquota de uso, esta foi preparada com 50 µL da alíquota stock e 900 µL de solução de hibridação (Tabela 2), o que equivale a uma concentração de 200 nM. Estas alíquotas foram guardadas no frigorífico a 4 °C.

Solução de Lavagem

A solução de lavagem foi preparada com os reagentes presentes na Tabela 3.

Tabela 3 - Composição da Solução de Lavagem. Concentração dos diferentes reagentes e respetivas quantidades utilizadas na preparação de 500 ml de solução (todos os compostos são provenientes da empresa Sigma-aldrich, Espanha).

Compostos e respetiva concentração na solução	Quantidade para 500 ml
5 mM Tris Base	0,303 g
15 mM NaCl	0,438 g
1 % (v/v) Triton-X	0,500 ml

Após a dissolução de todos os reagentes, fez-se o volume final com água destilada e acertou-se o pH a 10. Autoclavou-se a solução (121°C, 15 minutos) e guardar a 4°C.

Solução de Paraformaldeído 4% (v/v) (Paraformaldeído Fixativo) (todos os compostos eram provenientes da empresa Sigma-aldrich, Espanha).

A preparação de 100,0 ml de solução de Paraformaldeído efetuou-se da seguinte forma:

1. Aqueceu-se 65,0 ml de água destilada a 60 °C e adicionou-se, na hotte, 4,00 g de paraformaldeído;
2. Manteve-se a solução na placa térmica sob agitação e adicionou-se, gota a gota, NaOH (2M) para clarificar a solução que se encontrava esbranquiçada;

3. Retirou-se da fonte de calor e adicionou-se 33,0 ml de 3x PBS (preparação está abaixo descrita na Tabela 4). Ajustou-se o pH a 7,2 com HCl (1 M);
4. Filtrou-se a solução através de um acrodisco de porosidade 0,2 µm. Arrefeceu-se rapidamente até aos 4 °C, no frigorífico ou com gelo.

Solução 3xPBS (Phosphate Buffered Saline)

A solução 3xPBS continha os reagentes presentes na tabela 4. Esta solução foi necessária na preparação do paraformaldeído a 4% (v/v).

Tabela 4 - Composição da Solução 3xPBS. Concentração dos diferentes reagentes e respetivas quantidades utilizadas na preparação de 200 ml de solução. (todos os compostos são provenientes da empresa Sigma-aldrich, Espanha).

Compostos e respetiva concentração na solução	Quantidade para 200 ml
180 mM NaCl	4,80 g
3 mM KCl	0,120 g
9 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,486 g
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,120 g

Após a dissolução de todos os reagentes, fez-se o volume final com água destilada e autoclavou-se a solução (121°C, 15 minutos).

Solução de lise

A solução de lise continha os reagentes presentes na tabela 5.

Tabela 5 - Composição da Solução de lise. Concentração dos diferentes reagentes e respetivas quantidades utilizadas na preparação de 15 ml de solução. (todos os compostos eram provenientes da empresa Sigma-aldrich, Espanha).

Compostos e concentração respetiva na solução	Quantidade para 15 ml
2,5 M NaCl	2,192
0,1% (v/v) Triton X-100	0,0150
10 mM Tris-base	0,01817
100 mM Disodium EDTA	0,5584

Usaram-se vários meios líquidos standard: meio Heart Infusion (BHI), meio Fraser e demi Fraser.

Protocolos utilizados:

Protocolo para otimização da técnica PNA FISH

O método de hibridação em lâmina foi baseado no protocolo descrito por Almeida et al. [74].

1. Preparou-se um inóculo de uma cultura fresca do microrganismo a analisar, em água destilada autoclavada.
2. Colocou-se 20 µL da solução preparada anteriormente (que deve ser relativamente diluída) em cada poço das lâminas. Deixou-se secar na estufa.
3. Cobriu-se a superfície da amostra com solução 4% (v/v) paraformaldeído (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de paraformaldeído.
4. Colocou-se sobre cada poço 30 µL etanol 50% (v/v) de modo a cobrir a superfície da amostra e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de etanol.
5. Adicionou-se 20 µL de sonda da alíquota para uso (200 nM) a uma das lâminas e cobriu-se com a lamela com o cuidado de não criar bolhas de ar. Colocaram-se as lâminas em caixas de Petri previamente envoltas em papel de alumínio e com papel absorvente húmido lá dentro. Deixou-se incubar durante 1h à temperatura de hibridação da sonda a testar.
6. Encheu-se um *coplin jar* (recipiente próprio para lavagem de lâminas de microscopia) com solução de lavagem e colocou-se na estufa junto com as lâminas para pré-aquecer.
7. Após o tempo de hibridação, retiraram-se as lâminas das caixas de Petri, removeram-se as lamelas e mergulharam-se as lâminas na solução de lavagem. Colocaram-se os *coplin jar* na estufa à temperatura de hibridação durante 30 minutos.
8. No final da lavagem, retiraram-se as lâminas e deixou-se secar ao ar, no escuro.
9. Procedeu-se à observação ao microscópio, colocando óleo de imersão sobre cada poço. A visualização dos resultados do procedimento da hibridação *in situ* foi realizada recorrendo a um microscópio de epifluorescência Nikon eclipse 80i. O

microscópio possui duas objetivas a seco com ampliação de 10x, 40x e duas objetiva de imersão, 60x e 100x. Está equipado com um sistema de filtros (DAPI, FITC, TRITC), uma câmara a cores para aquisição de imagem (Nikon DS-Fi1) e um software para captação e tratamento de imagem (NIS-Elements BR 3.2). Como referido anteriormente, o fluorocromo ligado à sonda de PNA utilizada é o Alexa Fluor 594 que emite fluorescência na zona do vermelho. Por esta razão, o filtro utilizado para deteção de fluorescência na amostra foi o filtro TRITC. Os filtros azul (DAPI) e verde (FITC) não são capazes de detetar o sinal do fluorocromo utilizado mas são úteis para confirmar a ausência de autofluorescência das amostras, servindo como controlo negativo.

Diferentes tipos de fixação:

A etapa de fixação foi otimizada com a aplicação de diferentes estratégias de fixação (substituição do ponto 3 e 4 do protocolo de otimização de PNA FISH):

- **Triton X 1% (v/v):** Cobriu-se a superfície da amostra com solução 1% (v/v) triton X (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de triton X.

-**Metanol absoluto.:** Cobriu-se a superfície da amostra com metanol absoluto (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de metanol.

-**Etanol 80% (v/v):** Cobriu-se a superfície da amostra com etanol 80% (v/v) (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de etanol.

-**Triton X 1% (v/v) + Paraformaldeído 4% (v/v) + Lisozima (5 mg/mL):** Cobriu-se a superfície da amostra com solução triton X 1% (v/v) (cerca de 30 µL) e deixou-se secar na estufa. Cobriu-se a superfície da amostra com solução paraformaldeído 4% (v/v) (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de paraformaldeído 4% (v/v). Cobriu-se a superfície da amostra com solução Lisozima (5 mg/mL) (cerca de 30 µL) e incubou-se durante 30 minutos a 37°C.

Paraformaldeído 4% (v/v) + Solução lise: Cobriu-se a superfície da amostra com solução paraformaldeído 4% (v/v) (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de paraformaldeído 4% (v/v). Cobriu-se a superfície da amostra com solução de lise (cerca de 30 µL) e incubou-se durante 10 minutos a 57°C. Retirou-se o excesso de solução de lise.

Metanol absoluto + Solução lise: Cobriu-se a superfície da amostra com metanol absoluto (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de metanol. Cobriu-se a superfície da amostra com solução de lise (cerca de 30 µL) e incubou-se durante 10 minutos a 57°C. Retirou-se o excesso de solução de lise.

Etanol 80 % (v/v) + Solução lise: Cobriu-se a superfície da amostra com etanol 80% (v/v) (cerca de 30 µL) e deixou-se repousar durante 10 minutos. Retirou-se o excesso de etanol. Cobriu-se a superfície da amostra com solução de lise (cerca de 30 µL) e incubou-se durante 10 minutos a 57°C. Retirou-se o excesso de solução de lise.

Testes em alimentos:

1. Protocolo da ISO 11290:2004

1. Inoculou-se *L. monocytogenes* (CECT 5725) em 50 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI). Colocou-se a amostra em agitação (120 rpm), a 37 °C.
2. Retirou-se uma amostra e realizaram-se diluições de 1:2 e 1:4 para garantir uma concentração de 10^8 UFC/mL. A partir da solução de 10^8 UFC/mL, retiraram-se 100 µL para um Eppendorf, diluindo com 900 µL de tampão PBS, resultando numa concentração de 10^7 UFC/mL. Realizaram-se diluições sucessivas para obter soluções de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 100, 10, 1, 0.1 e 0.01 UFC/mL.
3. Diluíram-se 25 g ou 25 mL do alimento a testar em 225 mL de meio demi Fraser. Inocularam-se 100 µL das soluções de 100 a 0.01 UFC/mL. Incubou-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 ± 3 h (1º enriquecimento).
4. No final do 1º enriquecimento, inocularam-se 10 mL de meio Fraser com 0.1 mL do primeiro enriquecimento. Incubou-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 2 h (2º enriquecimento).
5. Após o primeiro e segundo enriquecimento, inocularam-se placas de Chromoagar e Oxford com 100 µL, durante 24h, a 37°C.

2. PNA FISH

Para o teste em alimentos preparou-se um protocolo adaptado à ISO 11290:2004 para poder existir uma comparação entre os dois métodos. O protocolo otimizado está descrito de seguida.

1. Inoculou-se *L. monocytogenes* (CECT 5725) em 50 mL de meio Brain Heart Infusion (BHI). Colocou-se a amostra em agitação (120 rpm), a 37 °C.
2. Retirou-se uma amostra e realizaram-se diluições de 1:2 e 1:4 para averiguar o volume inicial a utilizar na primeira diluição, garantindo uma concentração de 10^8 UFC/mL. A partir da solução de 10^8 UFC/mL, retiraram-se 100 µL para um Eppendorf, diluindo com 900 µL de tampão PBS, resultando numa concentração de 10^7 UFC/mL. Realizaram-se diluições sucessivas para obter soluções de 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 1000, 100, 10, 1, UFC/mL.
3. Diluíram-se 25 g ou 25 mL do alimento a testar em 225 mL de meio BHI. Inocularam-se 100 µL das soluções de 100 a 1 UFC/mL. Incubou-se a $36 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 48 ± 3 h.
4. Retiraram-se amostras às 18, 24 e 48h e realizou-se o PNA FISH como descrito em cima.
5. Com as amostras de cada tempo, inoculou-se em placas Oxford (em triplicado) 3 gotas de 10 µL de amostra (utilizando a técnica da gota) e incubaram-se a 37°C durante 24 horas. De seguida fizeram-se contagens, com a finalidade de verificar se as diluições estavam corretas, assim como se a experiência decorria como o esperado.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Otimização das condições de hibridação da sonda

Na otimização das condições de hibridação da sonda foi seguido o protocolo usado por Almeida et al. [74], com pequenas alterações. A sonda utilizada é específica para a estirpe de *L. monocytogenes* (Lis 594). As gamas de temperaturas testadas para a otimização das etapas de hibridação e lavagem foram: 57, 59 e 61°C. Por outro lado, também foi testado o uso de uma sonda bloqueadora (5'-GACCCTTTGTACCAT-3') conjuntamente com a sonda "Lis 594" (5'- GACCCTTTGTACTAT -3'). Esta sonda bloqueadora tem a finalidade de aumentar a especificidade da sonda "Lis 594" para as

estirpes patogénicas (*L. monocytogenes*) dentro do género *Listeria* spp.. A sonda bloqueadora é uma sonda de PNA que não possui fluorocromo acoplado, sendo específica para estirpes não patogénicas do género *Listeria* [12], concorrendo para a mesma sequência ribossomal. Assim, provocou-se uma competição entre os dois tipos de sondas. A sonda bloqueadora ligou-se às estirpes não patogénicas de *Listeria* spp., evitando que a sonda Lis 594 se ligasse a estas. Apesar de a sonda Lis 594 ser específica para *L. monocytogenes*, existe a possibilidade desta se ligar a estirpes não patogénicas de *Listeria* spp., uma vez que estas são idênticas diferindo apenas num par de bases. Deste modo, conferiu-se um aumento de especificidade à deteção, pois a utilização de uma sonda bloqueadora permite reduzir o número de resultados falsos positivos.

A otimização das condições de hibridação (temperatura de Hibridação/Lavagem e uso de sonda bloqueadora) foi conseguida pela realização de vários testes com/sem utilização da sonda sonda bloqueadora a diferentes gamas de temperatura. Foram estudadas 44 estirpes do género *Listeria* (Tabela 6), dividindo-se em 8 estirpes de coleções CECT (Colecção Espanhola de Cultivos Tipo) de *L. monocytogenes*; 16 estirpes de coleções CECT de não *L. monocytogenes*; 12 estirpes de isolados de *L. monocytogenes*; 6 estirpes de isolados de não *L. monocytogenes*. Os resultados da utilização, da sonda “Lis 594” só, assim como a temperatura de hibridação/lavagem de 61°C foram descartados em virtude do elevado número de falsos positivos e negativos que estas condições apresentaram. Os resultados com as condições otimizadas são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados obtidos nas hibridações realizadas a 57 e a 59 °C com a sonda na presença sonda bloqueadora. O sinal “+” representa ocorrência de hibridação e o “-” representa que não ocorreu hibridação.

Estirpes	Com BP	
	57 ° C	59° C
<i>L. monocytogenes</i> CECT 936	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 5725	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 5873	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 934	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 938	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 911	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 933	+	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 937	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1983	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 2241	+	+

<i>L. monocytogenes</i> 2020	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1360	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1014	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1809	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 832	-	+
<i>L. monocytogenes</i> 924	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 1153	-	+
<i>L. monocytogenes</i> 923	-	+
<i>L. monocytogenes</i> 925	+	+
<i>L. monocytogenes</i> 747	+	+
<i>L. grayi</i> CECT 931	-	-
<i>L. grayi</i> CECT 4181	-	-
<i>L. grayi</i> 942	-	-
<i>L. seeligeri</i> CECT 5339	-	-
<i>L. seeligeri</i> CECT 917	-	+
<i>L. seeligeri</i> CECT 5340	-	-
<i>L. welshimeri</i> CECT 919	-	-
<i>L. welshimeri</i> CECT 5370	-	-
<i>L. welshimeri</i> CECT 5371	-	-
<i>L. welshimeri</i> CECT 5380	-	-
<i>L. ivanovii</i> and CECT 5375	-	-
<i>L. ivanovii</i> and 2136	-	-
<i>L. ivanovii</i> and CECT 5369	+	-
<i>L. ivanovii</i> and CECT 5368	-	-
<i>L. ivanovii</i> and CECT 5374	-	-
<i>L. ivanovii</i> and CECT 513	-	-
<i>L. ivanovii</i> and CECT 913	-	-
<i>L. ivanovii</i> and 1326	+	-
<i>L. innocua</i> CECT 1141	-	-
<i>L. innocua</i> CECT 5376	-	-
<i>L. innocua</i> 4030	-	-
<i>L. innocua</i> 910	-	-
<i>L. innocua</i> 2110	-	-
<i>L. innocua</i> 1325	-	-

Com a utilização da temperatura de 57 e 59°C na Hibridação/Lavagem obtiveram-se resultados bastante interessantes. Ambas as temperaturas revelaram resultados falso-positivos (2 resultados falso-positivos a 57°C e 1 a 59°C). No entanto, com a utilização da temperatura de 57°C verificaram-se 3 resultados falsos-negativos, não se tendo verificado nenhum resultado falso-negativo a 59°C. Esta diferença era espectável, pois com o aumento da temperatura ocorre o aumento da especificidade da sonda [52]. Em

termos de intensidade de sinal, verificou-se um sinal mais intenso à temperatura de 57°C comparativamente com a temperatura de 59°C. O sinal mais intenso permitirá uma maior facilidade de identificação de um sinal positivo [49, 59, 60]. Contudo, torna-se bastante problemático o aparecimento de resultados falsos-negativos e positivos, sendo este fator uma limitação ao método [61, 62]. Em face dos factos ocorridos, optou-se pela utilização da temperatura de Hibridação/Lavagem a 59°C para o teste em alimentos, não obstante o sinal ser menos intenso.

2.3.2 Teste em alimentos

Concluída a otimização das condições de hibridação, realizou-se o teste em alimentos. O leite foi a matriz escolhida. Este deve ser ultrapasteurizado (UHT), para garantir que não havia contaminação com *Listeria* spp. [11]. O leite foi artificialmente contaminado com concentrações definidas de *L. monocytogenes*. Simultaneamente, foi aplicada a ISO 11290:2004 e a técnica PNA FISH. Esta última foi realizada no final das 24 horas, do primeiro e segundo enriquecimento e no final das 48 horas do segundo enriquecimento. Através da aplicação do método de cultura confirmou-se o elevado limite de deteção (1 CFU por 25 mL de leite), bem como o elevado tempo que este método necessita para ser realizado (2 tipos de enriquecimento num total de 36 horas) [24]. Nas placas seletivas de Oxford agar verificou-se a presença de colónias pretas circundadas por uma área negra, indicativas da presença de *Listeria* spp. A presença de *L. monocytogenes* foi confirmada pelo aparecimento de colónias azul-esverdeadas, com um halo opaco nas placas seletivas de Chromagar. Contudo, não se conseguiu observar resultados positivos com a aplicação da técnica de PNA FISH em nenhum dos tempos acima analisados. Em face destes resultados suspeitou-se que os meios utilizados no enriquecimento (Demi Fraser e Fraser) poderiam afetar a visualização dos mesmos. Está descrito que a hidrólise da esculina presente nestes meios, resulta no escurecimento do meio, formando um precipitado preto-acastanhado [77]. Consequentemente, optou-se pela realização de uma única fase de enriquecimento (48 horas), em que se utilizou o meio BHI. Esta opção justificou-se pelo facto do crescimento, em placa e em meio líquido, já ser realizado neste meio, porque está descrito que é um meio ideal ao crescimento da bactéria [78]. Deste modo, observaram-se resultados satisfatórios com uma única etapa de enriquecimento, conseguindo-se observar a *L. monocytogenes* no final das 24 horas de enriquecimento até uma concentração de 1 CFU por 25 mL de leite. No entanto, o sinal verificado foi mais fraco que o observado na otimização em

placa. Por consequência, suspeitou-se que poderia não estar otimizada a etapa de fixação. A fixação adotada foi a genérica, utilizada, geralmente, na técnica de PNA FISH. Esta fixação já foi utilizada com sucesso na detecção de *Salmonella* spp. [74] e noutras bactérias Gram-negativas [63]. Contudo, pelo facto de a *Listeria* spp. ser uma bactéria Gram-positiva [10], poderá ocorrer uma interferência na etapa de fixação com os agentes fixadores utilizados, devido às diferenças ao nível da parede celular. Na *L. monocytogenes* poderá ter ocorrido uma insuficiente permeabilização da membrana, levando a que a penetração da sonda não fosse eficaz. Consequentemente, a ligação à sequência de rRNA alvo seria menos efetiva. Adicionalmente, alterações na integridade celular ou na morfologia celular [49] podem levar a que quantidades suficientes de rRNA não estejam disponíveis. Consequentemente, a ligação à sequência de rRNA alvo seria menos efetiva, verificando-se um sinal mais fraco de fluorescência [55]. As diferenças dos resultados verificados entre o teste em placa e o teste em alimentos poderão dever-se à complexidade da matriz estudada (o leite). Para tal, tornou-se fulcral, otimizar a etapa de fixação do método de PNA FISH.

2.3.3 Otimização da Fixação

Para confirmar que o problema se centrava na etapa de fixação, promoveu-se a realização de ensaios, com uma fixação enzimática, na qual se utilizaria o paraformaldeído 4% (v/v) para fixar as células e de seguida se aplicaria a lizosima. A lizosima catalisa a destruição do peptidoglicano da parede celular das bactérias [79], permitindo a eficaz permeabilização das membranas. Este tipo de fixação é bastante utilizado em bactérias Gram-positivas [78]. Os resultados da realização do PNA FISH, com esta etapa de fixação, são apresentados na Tabela 7. Este ensaio foi realizado com temperaturas de Hibridação/Lavagem de 57 e 59°C. Com esta gama de temperaturas pretendia-se verificar se os resultados falso-negativos apresentados a 57°C se deviam à não otimização da etapa de fixação. Pela análise da Tabela 7 consegue-se confirmar que existia um problema na etapa de fixação. A intensidade do sinal continuou a ser mais forte a 57°C, no entanto, para ambas as temperaturas houve uma melhoria significativa da qualidade do sinal. Estes resultados foram utilizados como controlo positivo, ou seja, utilizaram-se estes resultados para comparar com outras estratégias de fixação. Este tipo de fixação não foi escolhido como passo de fixação deste método, já que a sua otimização teve como finalidade a realização de um kit para venda. Assim, uma fixação deste tipo, aumenta o tempo de realização do método, já que é uma etapa mais

demorada (demora 40 min) que a básica (paraformaldeído 4% e etanol 50%). Por outro lado, por se tratar de uma enzima, tem que se ter em conta o maior rigor das condições de armazenamento dum futuro kit e a temperatura ótima de atuação da enzima, levando a maiores despesas por partes dos laboratórios com a aplicação e armazenamento do kit e a um aumento da complexidade na aplicação da técnica.

Tabela 7: Resultados obtidos nas hibridações realizadas a 57 e 59°C usando na fixação Triton X (1% v/v), Paraformaldeído (4% v/v) e Lisozima (5mg/mL). Em que “+++” representa um sinal de hibridação muito forte; “++” representa um sinal de hibridação bom; “+” representa um sinal com hibridação parcial.

Estirpes	57°C	59°C
	Triton X +Paraformaldeído + Lisozima	Triton X +Paraformaldeído + Lisozima
<i>L. monocytogenes</i> CECT 5725	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i> CECT936	+++	+++
<i>L. monocytogenes</i> CECT 934	++	+
<i>L. monocytogenes</i> CECT 5873	++	++
<i>L. monocytogenes</i> CECT 933	++	++
<i>L. monocytogenes</i> CECT 937	++	++

A temperatura de 59°C foi excluída porque apesar de ambas terem dado bons resultados, a força do sinal que a 57°C, as amostras apresentavam, era um pouco mais forte. A temperatura de 57°C apresentava um sinal tão forte que não seria necessário um olho treinado para realizar a deteção. Como já foi referido, o objetivo da otimização deste método passa pela utilização deste como um kit para a deteção rápida de *L. monocytogenes*. Para este efeito será necessário simplificar, ao máximo, a visualização dos resultados ao microscópio. No entanto, o problema dos falsos-negativos não foi desprezado. No futuro será necessário realizar testes às estirpes que deram resultados falso-negativos, com a finalidade de verificar se uma fixação otimizada resolverá este problema.

Com o objetivo de se encontrar o melhor método de fixação das células foram testadas varias estratégias e comparadas ao sinal do controlo positivo (Lisozima). Estas

encontram-se resumidas na Tabela 8. A estratégia que obteve resultados mais concordantes foi a utilização de etanol a 80% (v/v) [80], com a posterior aplicação da solução de lise [81]. Esta conjugação de soluções revelou os resultados apresentados na Tabela 9. Estes resultados resolvem alguns problemas verificados na fixação paraformaldeído/etanol, associados com resultados falso-positivos, reduzindo para um resultado falso-negativo (este hibrida com um sinal fraco). Com a etapa da fixação otimizada foi necessário voltar a realizar testes no leite, para verificar se todos os problemas assinalados, anteriormente, teriam sido resolvidos.

Tabela 8: Diferentes estratégias utilizadas na otimização da etapa de Fixação.

Estratégias de fixação
Triton X 1% (v/v)
Metanol absoluto.
Etanol 80% (v/v)
Paraformaldeído 4% (v/v) + Solução lise
Metanol absoluto + Solução lise
Etanol 80 % (v/v) + Solução lise

Tabela 9: Resultados da etapa de Fixação otimizada, utilizando-se etanol 80% (v/v) e solução de lise, a 57°C. Em que “+++” representa um sinal de hibridação muito forte; “++” representa um sinal de hibridação bom; “+” representa um sinal com hibridação parcial;”+- “representa um sinal de hibridação fraco; “-” representa um sinal de hibridação negativa.

Estirpes	Intensidade de sinal de fluorescência
<i>L. monocytogenes</i> CECT 5725	+++
<i>L. monocytogenes</i> CECT 936	+++
<i>L. monocytogenes</i> CECT 934	++
<i>L. monocytogenes</i> CECT 5873	++
<i>L. monocytogenes</i> CECT 933	+-
<i>L. monocytogenes</i> CECT 937	++
<i>L. grayi</i> CECT 931	-
<i>L. seeligeri</i> CECT 5340	-
<i>L. welshimeri</i> CECT 919	-
<i>L. ivanovii</i> and CECT 5369	+-
<i>L. ivanovii</i> and 1326	-
<i>L. innocua</i> CECT 1141	-

2.3.4 Teste no leite com a fixação otimizada

O teste no leite compreendeu a realização do PNA FISH às 18, 24 e 48 horas de enriquecimento. Os resultados desta análise estão sumariados na Tabela 10 e podem ser visualizados para a concentração de 100 CFU por 25 mL de leite, na Figura 6. Estes resultados são bastante satisfatórios, já que para todos os tempos testados se conseguiu visualizar a hibridação pelo menos até à concentração de 1 CFU por 25 mL de leite. Adicionalmente, verificou-se um sinal, menos intenso, às 18 horas e 48 horas comparativamente às 24 horas de enriquecimento. Este facto é justificado pelas contagens de CFU's que foram realizados em placas Oxoford (Figura 7). Às 18 horas de enriquecimento existiu uma menor concentração celular comparativamente às 24 horas. Assim, conclui-se que as 18 horas podem coincidir com a fase exponencial e as 24 horas com a fase estacionária. Por um lado, nas 48 horas também se verificou uma menor concentração celular comparativamente com as 24 horas de enriquecimento. Consequentemente associa-se as 48 horas de enriquecimento com a fase de morte celular. Por outro lado, conseguir-se observar resultados às 18 horas de enriquecimento torna-se bastante vantajoso, na medida em que, os laboratórios podem realizar um enriquecimento “over night” (18-20 horas), encurtando o tempo útil que poderia ocupar um enriquecimento de 24 horas. O método de PNA FISH sem enriquecimento demora 3 horas, e com uma fase de pré-enriquecimento durante a noite encurta-se o tempo que um técnico de laboratório teria que despendar na realização deste método.

Tabela 10: Resultados da aplicação da técnica de PNA FISH em amostras de leite previamente contaminado com concentrações definidas.

	18h	24h	48h
100 CFU	+	+	+
10 CFU	+	+	+
1 CFU	+	+	+

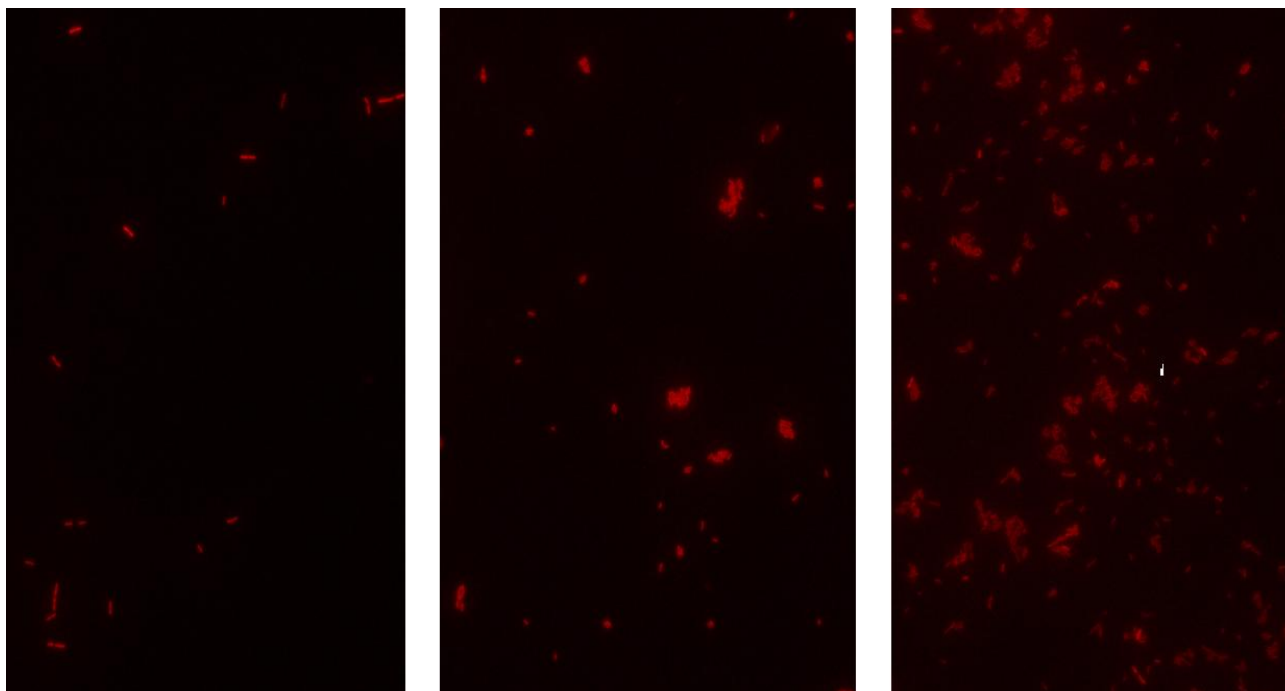


Figura 6: Imagens referentes a detecção de *L. monocytogenes* em leite (100 CFU por 25 mL) através da técnica de PNA FISH aos tempos de 18, 24 e 48 horas de enriquecimento.

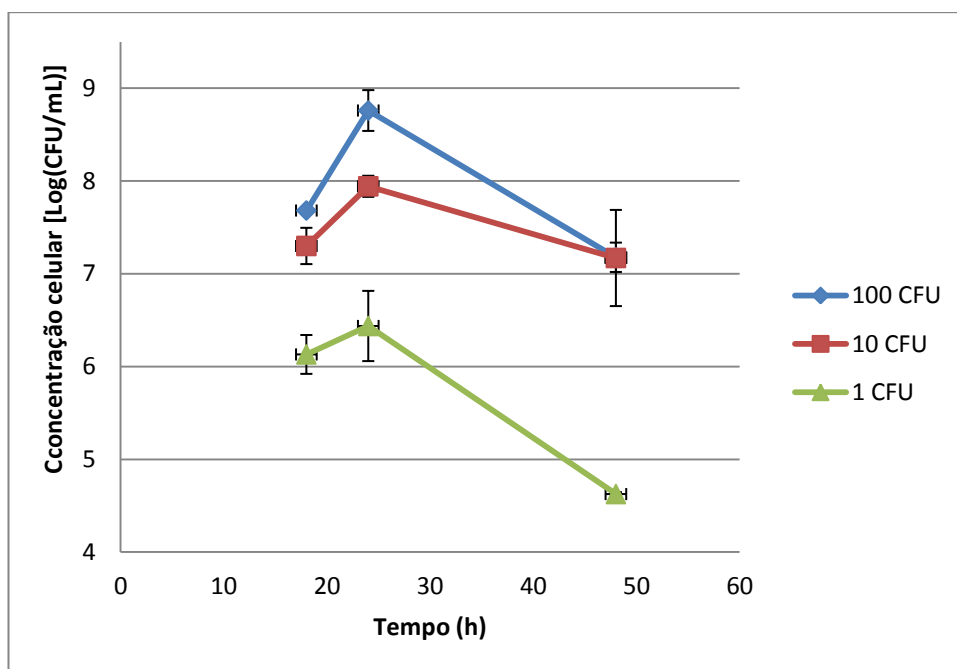


Figura 7: Representação gráfica do logaritmo da concentração celular às 18, 24 e 48 horas de enriquecimento.

2.4 Conclusão e trabalhos futuros

A otimização da técnica PNA FISH para a detecção de *L. monocytogenes* foi realizada com sucesso. As etapas de Fixação, Hibridação e Lavagem foram otimizadas

para esta detecção. Uma fixação com etanol (80% v/v) e solução de lise aliada a hibridação/Lavagem a 57°C e a utilização da sonda específica para *L. monocytogenes* conjuntamente com uma sonda bloqueadora tornaram-se fulcrais para realizar esta detecção.

Este método mostrou ser simples de realizar, bastante sensível, específico e com um limite de detecção de pelo menos 1 CFU por 25 mL. Todos estes parâmetros vão de encontro às necessidades do mercado de detecção microbiológica. Assim, este reúne todas as condições de um método inovador, que depois de validado pelas entidades competentes, se tornará num método, amplamente, utilizado a nível mundial.

Como trabalhos futuros será necessário proceder à realização da técnica PNA FISH com a fixação otimizada para todas as estirpes enunciadas na Tabela 6, para se comprovar a inexistência de resultados falsos-positivos e negativos. Por outro lado, também se torna necessário realizar o teste no leite a concentrações mais baixas, como 0,1 e 0,001 CFU por 25 mL, de modo a determinar o limite de detecção do método para o teste no leite. Também será fulcral realizar o método PNA FISH noutra amostra alimentar (p.e. carne picada), comparando esses resultados com os obtidos no leite.

Capítulo 3. Certificação do Probe4Salmonella pela AOAC

3.1 Enquadramento teórico

A Biomode S.A. é uma *startup* com origem na Universidade do Minho e que tem como objetivo a comercialização de métodos de diagnóstico moleculares baseados na tecnologia PNA FISH com aplicações clínicas e na indústria agroalimentar. O kit Probe4Salmonella é o primeiro produto que a Biomode S.A. pretende introduzir no mercado. Este produto visa a deteção de rápida de *Salmonella* spp. em alimentos. Apesar de na área alimentar não ser necessária a certificação dos produtos, a Biomode S.A. pretende certificar o produto, de modo a garantir que este seja tão bom ou melhor do que os produtos concorrentes [82]. A certificação permite uma melhor aceitação do produto no mercado, cumprindo com os interesses de todas as entidades envolvidas. Existem várias entidades certificadoras para a área alimentar. A nível europeu destaca-se a “Association Française de Normalisation” (AFNOR) [83] e nos Estados Unidos da América a “Official Analytical Chemists International” (AOAC International) [84]. Assim, a Biomode S.A. escolheu a entidade “AOAC International” para realizar a certificação do kit Probe4Salmonella, pois inicialmente o mercado alvo deste produto será os Estados Unidos da América.

A AOAC International é uma associação independente que se dedica a promover métodos de validação e medição de qualidade em ciências analíticas. Esta associação foi formada em 1984, sob o nome de “Association of Official Agricultural Chemists” com a finalidade de uniformização dos métodos de análise de fertilizantes. Os estatutos da AOAC têm sido alterados ao longo dos anos para abranger um maior número de atividades. Em 1991 o nome foi modificado para “Association of Official Analytical Chemists” para refletir a ampla gama compreendida pela mesma. Este voltou a ser alterado em 1991 de modo a realçar o carácter mundial das atividades desta associação e dos seus membros (AOACInternational) [84].

A AOAC International tem programas destinados à validação de métodos aplicados a microbiologia alimentar, destacando-se o “AOAC Official Method” e o “Performance Tested Methods (PTM)” [85]. O primeiro destina-se a métodos de análise em que as características de desempenho já foram determinadas e testadas [84]. O segundo é especificamente aplicado a kits, exigindo que os parâmetros de qualidade sejam confirmados por um laboratório independente [86]. Para a administração deste

programa está responsável a “AOAC Internacional Research Institute (AOAC-RI)”. Esta instituição apareceu em 1992 e é um subsidiário da AOAC Internacional.

3.2 Etapas

Para a certificação do kit Probe4Salmonella, produzido pela Biomode S.A. (o “produtor”), recorreu-se ao “PTM program”, pois apenas este é direcionado para análises baseadas em kits. Esta validação torna possível que os níveis de qualidade exigidos pelos produtores e clientes sejam garantidos por um laboratório independente [86]. O “PTM program” divide-se em 6 fases distintas: a consulta, a aplicação PTM, o estudo de validação do produtor, o estudo de validação independente, o relatório do estudo de validação e a revisão PTM [87]. A Figura 8 evidência a ocorrência destas 6 etapas.

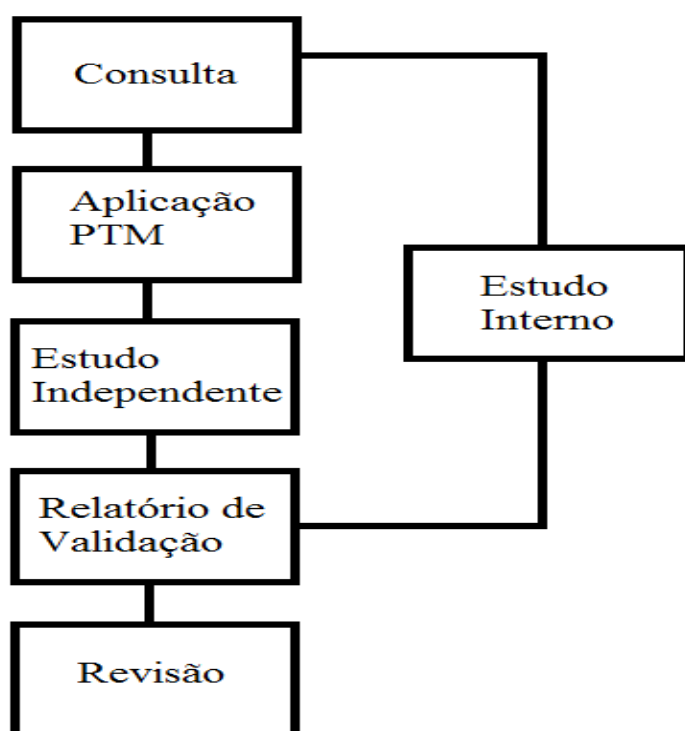


Figura 8: Etapas do “PTM program”.

Este programa começa pela fase de consultadoria, onde a empresa que desenvolve o método, e o consultor técnico da AOAC-RI discutem e decidem os objetivos da validação. Nesta fase o produtor necessita de preparar alguns documentos tais como, “Consulting Application” (aborda as variáveis a analisar), “Consulting Agreement” (acordo de consultadoria) e cópias das bulas do kit e manual de uso. Estes

documentos englobam os dados, acordos e taxas de aplicação necessárias para esta etapa. Nesta fase, são consideradas, pelas duas entidades, aspetos como o tipo de ensaio, o analito alvo (microrganismo alvo), a matriz (tipo de alimento), os mercados e as questões legais. Estas trabalham em conjunto com a finalidade de preparar o “Validation Outline” para o método em análise. Este é um documento formal que inclui a descrição detalhada do produtor, critérios de desempenho aceitáveis, relatório de submissão e o protocolo do estudo independente de validação, necessários para a compilação de dados. Assim, reuniram-se os documentos que descrevem os princípios do método e uso pretendido, matrizes a serem analisadas, protocolo de estudo de validação do produtor, protocolo dos ensaios laboratoriais a efetuar pelo laboratório independente, análises estatísticas necessárias, critérios de aceitabilidade, método de referência a comparar e modelo do relatório dos estudos. Este dossiê é analisado por um “AOAC General Referee/Topic Advisor” (revisor pertencente à AOAC), que é selecionado pela AOAC-RI. Este tem a função geral de avaliar os dados do desempenho do método e assim que for aprovado o esboço final, este é fornecido ao produtor [87].

Após a conclusão desta fase, o produtor pode escolher submeter a aplicação PTM, visto que não é obrigatório esta submissão, se não se pretender prosseguir com o processo. O produtor pode optar por ter mais tempo para se preparar para a revisão PTM, antes de submeter qualquer aplicação. Na fase de aplicação PTM a “AOAC-RI Program Manager” (entidade dentro da AOAC-RI responsável pela gestão do programa) nomeia um gestor de projeto para liderar a avaliação. Normalmente é escolhido o consultor técnico da fase de consulta para ocupar esta posição. Nesta fase são necessários os documentos referentes ao formulário de aplicação PTM, formulário de acordo PTM, conteúdo do Kit, bulas e manual de utilizador e descrição ou certificado de Sistema de Gestão de Qualidade (SGQ) utilizado na produção. Os produtores são encorajados a recomendar um potencial “Expert Reviewer” (perito independente) assim como um potencial laboratório independente para analisar o método. Estas duas entidades não podem estar relacionadas com o produtor. Contudo a AOAC RI não é obrigada a seguir esta recomendação.

O produtor tem que submeter uma aplicação PTM para cada método que pretende ser avaliado. O pacote de aplicação é revisto pelo *staff* da AOAC RI com a finalidade de verificar se está completo [87].

Depois da aplicação PTM estar completa, o gestor do projeto da AOAC RI identifica locais qualificados para a realização do estudo independente. Este também organiza o estudo de validação independente em cooperação com o produtor. No estudo de validação independente, o método de análise é testado dentro de condições laboratoriais controladas e este é caracterizado dentro das suas condições de utilização [87]. Após a conclusão do estudo no laboratório independente, um relatório de validação independente será entregue ao produtor. Este irá preparar o relatório do estudo de validação PTM com o formato previsto no “Validation Outline” que inclua tanto os resultados do produtor como os do laboratório independente [87]. Os dados do relatório do produtor devem provir de testes efetuados dentro das instalações do produtor ou pode ser subcontratada uma empresa para realizar estes mesmos testes. Este estudo tem que seguir exatamente o protocolo de validação do produtor inserido no “Validation Outline”. Os resultados devem fazer parte do relatório de estudo da validação do método [87].

Por último é realizada a revisão PTM, onde o relatório de validação do método conjuntamente com a bula e/ou manual de uso devem ser submetidas diretamente ao gestor do projeto. Este irá encaminhar os documentos com a apropriada revisão do “AOAC General Referee/ Topic Advisor” e “Expert reviewers”. O gestor de projeto deve encaminhar cada revisão ao produtor. Este é responsável por responder a todos os comentários e questões dos revisores. Todas as respostas e documentos revistos serão submetidos ao gestor de projeto que reencaminhará para “AOAC General Referee/ Topic Advisor” e para “Expert reviewers” para um comentário ou aprovação adicional. O processo continua até que se chegue a um consenso por parte dos 3 revisores para a aprovação ou rejeição [87].



Figura 9: Logótipo representativo da certificação PTM [87].

Um certificado PTM é emitido pela AOAC-RI para cada método de análise ao qual foi garantido o “PTM status”. Este certificado (Figura 9) possui um único número e um nome de certificado, aprovado para o método de análise. A marca PTM exige renovações anuais de modo a garantir que o kit não sofreu alterações relativamente ao que foi originalmente certificado e que este mantém o mesmo comportamento que o kit original. Caso isto não se verifique, serão necessários novos dados para renovar a certificação. Os certificados PTM tornam-se públicos através do sítio da AOAC [87].

3.3 Resultados e discussão

Para dar início à certificação segundo a AOAC era fundamental ter o produto já produzido, pois será necessário um estudo num laboratório independente [86]. A Biomode S.A. ainda não possui implementada as boas práticas de produção requeridas pela AOAC para a produção do kit. Na área alimentar a implementação da norma ISO 9001 resolve este problema. Consequentemente, a Biomode S.A. teve de subcontratar empresas para realizar a produção do kit. Para o fornecimento dos frascos e enchimento dos kits com as soluções que os compõem, foi escolhida a Moorfields Pharmaceuticals. Esta empresa britânica, ligada ao ramo farmacêutico oferece o serviço de produção por contrato para o fabrico de pequenos volumes em meio estéril. Ela reúne todos os requisitos exigidos pela AOAC para a produção do kit. Também foram escolhidas as empresas responsáveis pela produção da sonda (PANAGENE, Coreia do Sul) e pela cartonagem e folheto informativo (Lidergraf, Portugal).

A Biomode S.A. iniciou este processo, aquando da finalização da produção dos kits, dentro dos requisitos da AOAC. Foram preenchidos o “Consulting Application” e o “Consulting Agreement” (Anexo 1) necessários na fase de consultadoria. Nesta fase será também necessário redigir o “Validation Outline”. Este documento pressupõe a colaboração entre a Biomode S.A. e o consultor técnico da AOAC-RI para a preparação deste [87]. A Biomode S.A. foi ultimando toda a informação para facilitar este processo, definindo o tipo de ensaio, o analíto alvo (*Salmonella* spp.), a matriz (ovo), os mercados e as questões legais. Com o objetivo de facilitar todo este processo, neste trabalho redigiu-se documentação referente à descrição geral da empresa e da técnica (PNA FISH), assim como se escreveu numa forma detalhada o “Data Submission Requirement documents” (Anexo 1). Para este último documento foi necessário compilar dados referentes a trabalhos anteriores da Biomode S.A. durante a fase de

desenvolvimento do método [74, 88]. Assim pretende-se mostrar os trabalhos já feitos pelo produtor em várias matrizes, resumindo os procedimentos, mostrando os resultados ao nível dos parâmetros de precisão especificidade, sensibilidade, reatividade cruzada e limite de detecção. Foram também comparados todos estes parâmetros com os de métodos já existentes. Desta informação destaca-se um trabalho, no qual se demonstrou a especificidade e sensibilidade do método PNA FISH para a detecção de *Salmonella* spp.. Foram testadas 61 estirpes representativas do género *Salmonella*, 25 estirpes taxonomicamente relacionadas com a *Salmonella* spp. (*Shigella* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Pantoea* spp., *Yersinia* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia*, spp. and *Serratia* spp.) e 21 estirpes pertencendo a diferentes ordens (*Pseudomonas* spp.), classe (*Helicobacter* spp. e *Campylobacter* spp.), e sub-reino (*Listeria* spp. e *Staphylococcus* spp.) no qual se confirmou a especificidade da sonda (98,1%), assim como se realizou com sucesso detecções em diferentes matrizes previamente contaminadas (sangue, água, fezes e leite em pó para criança), atingindo-se um limite de detecção de 1 CFU por mL de sangue e 1 CFU por 10 g de leite em pó para crianças [74].

A Biomode S.A. possui também um trabalho referente à comparação entre a aplicação do método PNA FISH com técnicas convencionais (real time PCR, método de cultura e método de “immunocapture” em diferentes matrizes (ovos, leite e maionese). Aqui é demonstrado que o PNA FISH pode ser alternativa viável para os métodos de detecção tradicionais. Este revela-se ser tão específico e sensível como os métodos de cultura, tendo a mesma duração que os métodos moleculares [88].

Tanto a descrição da empresa e método, como o “Data Submission Requirement documents” serão documentos úteis para a preparação conjunta do “Validation Outline”, pois facilitará a definição dos critérios de aceitabilidade, e a escolha do método de referência a comparar, assim como fornecerá todo o tipo de informação necessária para o consultor técnico da AOAC-RI, auxiliando a adaptação deste perante o processo de certificação do kit da Biomode S.A. [86]. Será possível utilizar-se os métodos de real time PCR (iQ-Check[®] kit) ou “immunocapture” (RapidChek[®] SELECT *Salmonella* kit) como métodos de comparação no processo de certificação, pois estes são validados pela AOAC [89].

No término deste estágio o processo de certificação do kit Probe4*Salmonella* encontra-se na fase de consultadoria. Estão produzidos os kits destinados ao estudo no

laboratório independente. Estes foram produzidos seguindo todos os parâmetros de qualidade requeridas pela AOAC. Encontra-se redigida toda a informação para a preparação conjunta do “Validation Outline”. Nesta fase, a Biomode S.A. espera que lhe seja enviado este documento redigido pelo consultor técnico da AOAC-RI, para que posteriormente seja analisado pelos técnicos da Biomode S.A..

Capítulo 4 – Inquérito no âmbito da análise do mercado da deteção microbiológica

4.1 Enquadramento teórico

O kit Probe4Salmonella é o primeiro produto que a Biomode S.A. irá introduzir no mercado em virtude de ser o mais desenvolvido em termos de certificação de qualidade e na aplicação de propriedade intelectual. Com o objetivo de ir ao encontro dos requisitos dos clientes e obter informação para a facilitação da penetração dos seus produtos no mercado, a Biomode S.A. promoveu a realização de um inquérito em inglês. Com este questionário, a Biomode S.A. pretendeu saber quais os testes rápidos mais comumente utilizados e a quantidade média de testes feitos e se são efetivamente rápidos ou não. A análise centrou-se em quatro bactérias, *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *E. coli* spp. Este estudo decorreu durante Junho de 2012 e Janeiro de 2013. Foram inquiridos 727 laboratórios que realizam testes para deteção de microrganismos em alimentos, a nível mundial. Obtiveram-se 83 respostas, representando 11,4% da amostra. Este inquérito dividiu-se em 8 perguntas (Anexo 2), que serão apresentadas e discutidas em formato individual, assim como a correlação de alguns fatores que se tornam fulcrais para a melhor compreensão deste estudo. A nível deste inquérito, neste estágio fez-se a reunião da informação contida nas respostas, o seu tratamento e análise.

4.2 Respostas ao inquérito

- **Questão 1:** Por favor, informe-nos acerca da importância dos seguintes atributos para os seus programas de testes em alimentos?

Esta questão pretende mostrar quais as características que têm o maior valor ao nível das metodologias utilizadas em laboratórios, e procura informações sobre todos os tipos de exames microbiológicos realizados na área agroalimentar. A Figura 10 mostra os resultados para cada categoria analisada.

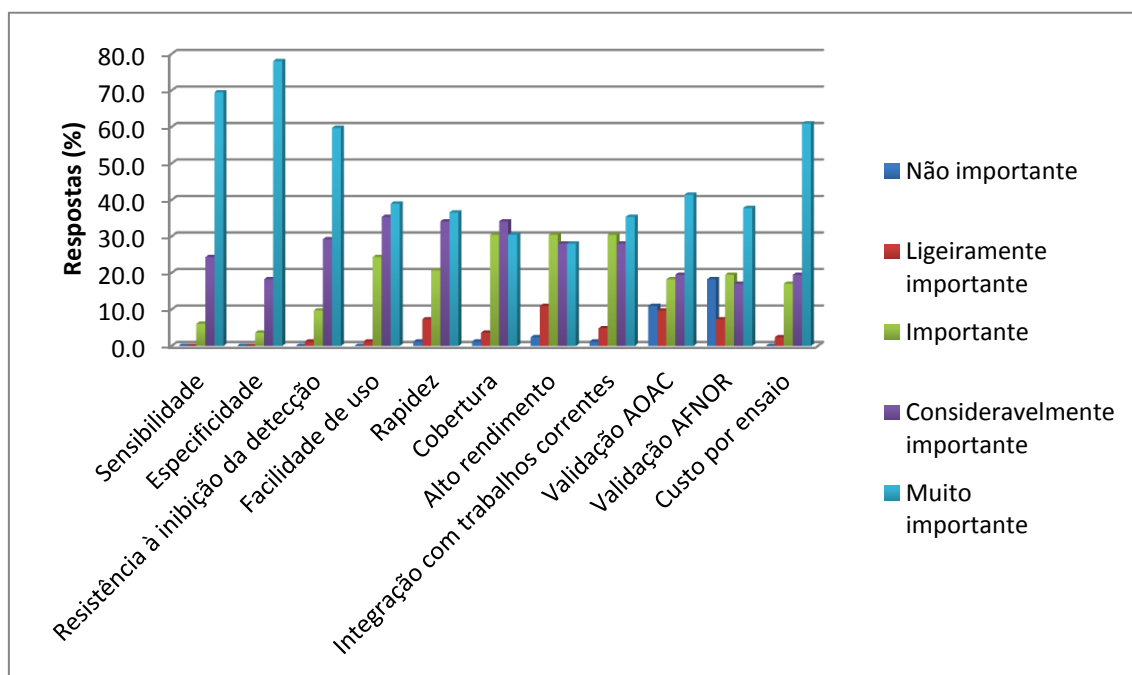


Figura 10: Resultados da questão 1, sobre a importância de vários atributos dos testes realizados em laboratórios agroalimentares.

Observando a Figura 10, pode-se concluir que os aspetos mais importantes são a "sensibilidade" (69,5%), "especificidade" (78%), "Resistência à inibição da detecção" (59,8%) e "Custo por ensaio" (61%). Os laboratórios preocupam-se em fornecer uma análise credível e não pretendem ter um grande esforço financeiro no uso / compra dos métodos / produtos, indo de encontro aos dados encontrados na bibliografia [20]. Pode-se concluir que o custo do método / produto é um fator que irá influenciar a decisão de compra do método / produto. Os atributos menos valorizados são o "Validação AOAC" e "Validação AFNOR". Estas categorias representam uma elevada gama de respostas como "não importante" (11 e 18%, respetivamente) em comparação com os outros parâmetros. No entanto, ambas as categorias possuem uma percentagem considerável de respostas como "muito importante" (41,5 e 37,8%, respetivamente). Isto mostra que o valor da certificação pode depender de laboratório para laboratório, contudo revela a credibilidade que a certificação confere (a certificação confere a confirmação da qualidade da análise do método) [82]. As outras cinco categorias têm uma quantidade considerável de resposta como "ligeiramente importante", "importante" e "consideravelmente importante", reforçando a importância de todos esses fatores, apesar de não serem cruciais para a decisão sobre o método de deteção de microrganismos a

usar pelos laboratórios. Esta questão torna-se fulcral para mostrar que os aspetos mais relevantes no âmbito do mercado de deteção de microrganismos coincidem com as características do kit Pro4Salmonella [74, 88].

- **Questão 2:** No seu laboratório, que tipo de método(s) são frequentemente usados para realizar testes microbiológicos.

Esta questão visa obter informações sobre os métodos mais usados em laboratórios para realizar testes microbiológicos em alimentos. Para esta categoria, foi fornecida mais do que uma opção de resposta. Os resultados estão ilustrados na figura 11. Como era esperado os métodos mais comuns são os baseados em cultura (83%) [21-23]. Métodos baseados em PCR aparecem como a segunda categoria dos mais utilizados neste tipo de ensaios (56%). A categoria "outros" abrange outras técnicas usadas na segurança alimentar. Podem enumerar-se técnicas baseadas na biologia molecular, tais como electroforese em gel de campo pulsado, o sistema de deteção molecular 3M (3M MDS), entre outros. Esta questão torna-se importante para a Biomode S.A. pois permite conhecer o nível de penetração dos métodos rápidos de deteção de microrganismos.

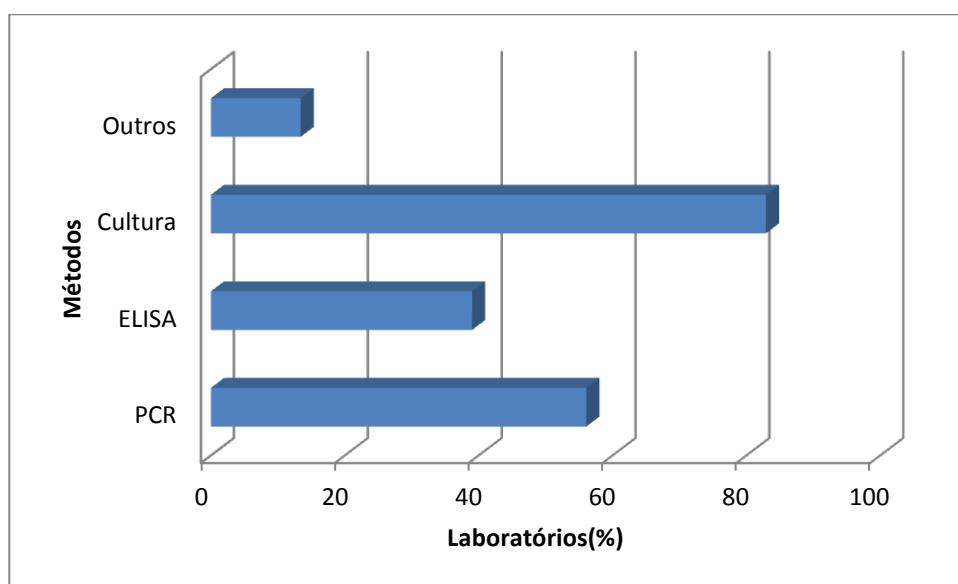


Figura 11: Percentagem dos diferentes métodos utilizados para análises microbiológicas em alimentos.

- **Questão 3:** Da seguinte lista de equipamentos, quais são os que estão disponíveis no seu laboratório?

O objetivo da questão 3 foi determinar que tipos de equipamentos que os laboratórios têm disponíveis nas suas instalações. Isto dá possibilidade de aferir a percentagem de laboratórios que possuem microscópio de fluorescência (essencial para o uso do PNA FISH). Como se pode observar na figura 12, o equipamento mais comum é o real time PCR (71%), seguido por o equipamento de PCR (63%). Apenas 23% detêm microscópio de fluorescência. Esta percentagem irá traçar a quota de mercado da Biomode S.A., e a facilidade dos laboratórios para a adesão ao kit Probe4Salmonella.

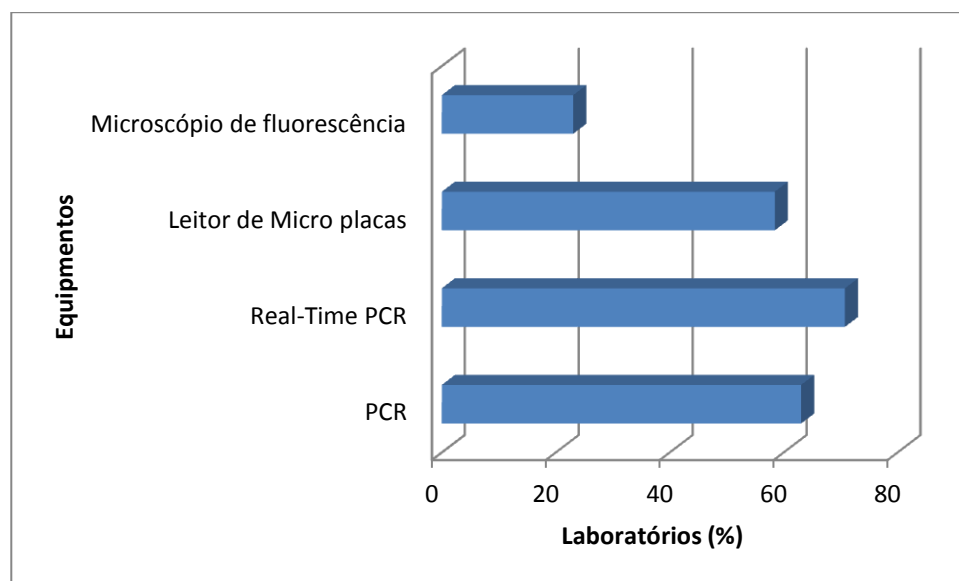


Figura 12: Análise das respostas relacionados com os equipamentos existentes nos laboratórios de análises microbiológicas em alimentos.

- **Questão 4:** Em média, quantos testes para a deteção dos seguintes agentes patogénicos, são utilizados mensalmente no seu laboratório?

Com esta pergunta pretendia-se medir os volumes de amostras realizadas, mensalmente, nos laboratórios de análises microbiológicas. A questão foi específica para a *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 e *E. coli* (figura 13). Esta análise possibilita ter uma ideia da importância, que os microrganismos alvo selecionados têm no mercado alimentar. Afigura-se que a maioria dos laboratórios não realizam mais de 100 testes mensais para as bactérias *E. coli* O157: H7 (78%) e *L. monocytogenes* (49%). No entanto, para os dois outros microrganismos, os resultados aparecem equivalentes em todas as categorias. Inicialmente, foi assumido que os laboratórios que fazem mais amostras mensais, são de maior dimensão. Esta questão permite concluir que o número de ensaios pode depender de laboratório para

laboratório, independentemente do tamanho deste. Aspetos relacionados com a localização, fatores ambientais ou época do ano podem influenciar o volume de ensaios.

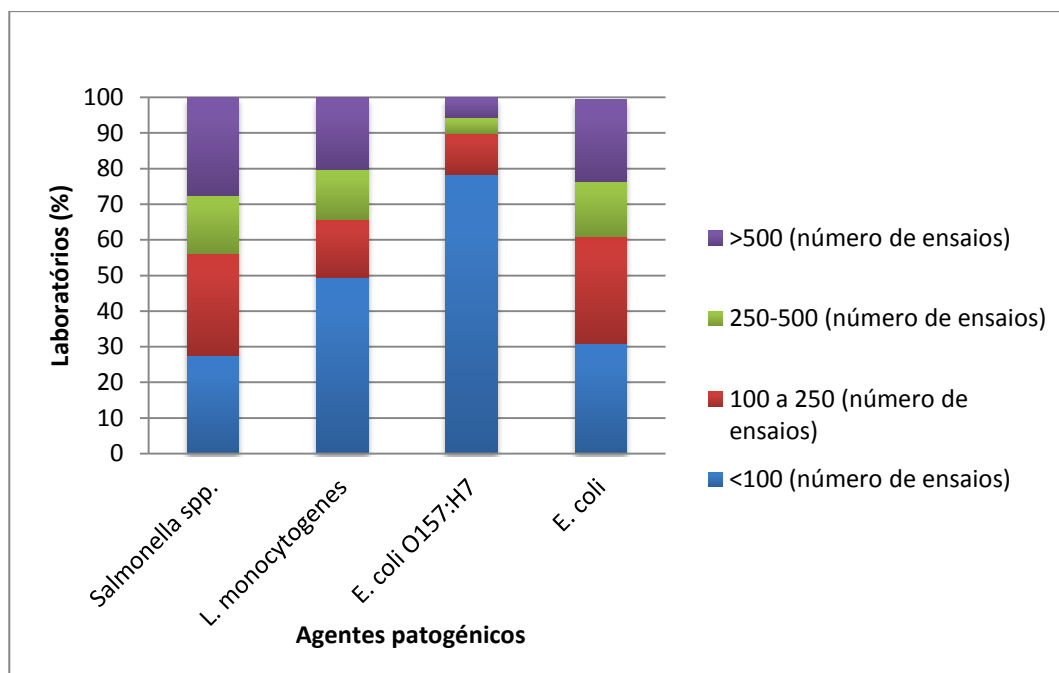


Figura 13: Percentagem de laboratórios que realizam testes microbiológicos para *Salmonella* spp, *L.monocytogenes*, *E. coli* e *E. coli* O157. As respostas agrupam-se nas seguintes categorias: <100, 100-250, 250-500 ou mais 500 número de ensaios por mês.

- **Questão 5:** Em média, quanto tempo demora a realização de um ensaio para cada um dos seguintes patogéneos (não incluído a etapa de enriquecimento)?

Esta questão, tinha como intuito saber quanto tempo demora a realização de um teste para detetar um microrganismo específico. E por conseguinte, entender se o tempo necessário à realização de um ensaio será uma questão importante para laboratórios de análises microbiológicas. Tendo em conta que o kit Probe4Salmonella demora 3h (após enriquecimento) a realizar um ensaio, era necessário saber se esta seria uma vantagem competitiva para a Biomode S.A.. A partir da observação da figura 14, verifica-se que a maioria dos laboratórios demora mais de 24 horas na realização de um teste, independentemente, do microrganismo testado. No entanto, alguns resultados apontam para a utilização de métodos rápidos na deteção de microrganismos (entre 16% e 24%) [20]. Uma justificação para estes factos será o número de respostas observadas na Questão 2, onde o método de cultura (método exigente) é o mais utilizado, por outro lado, na Questão 1, a velocidade da análise não é considerada um fator chave para os laboratórios em estudo.

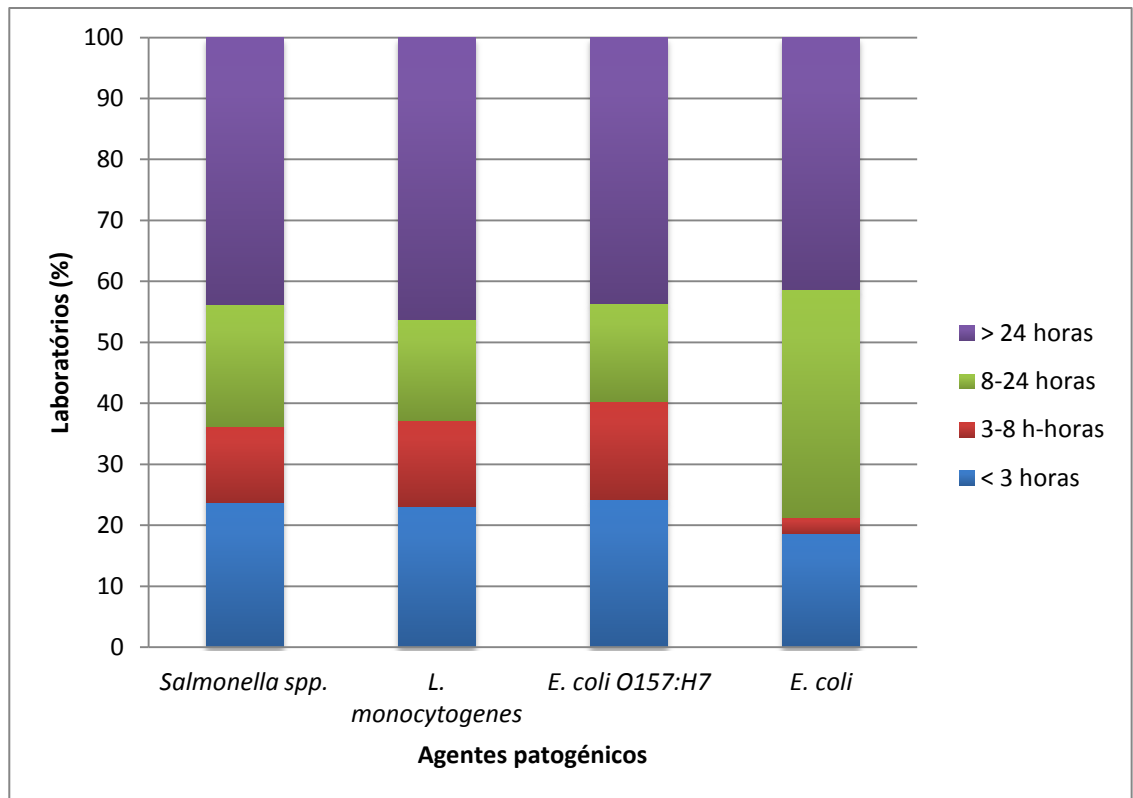


Figura 14: O tempo necessário para realizar uma deteção microbiológica (*Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *E. coli* O157), separados por classes de tempo: <3 horas, 3-8 horas, 8-24 horas e > 24 horas.

- **Questão 6:** Se usa kits de testes rápidos, para a realização dos ensaios para detetar estes patogénios, qual é a média do custo do kit por ensaio?

No âmbito desta questão, pretendeu-se saber o custo por ensaio que os laboratórios são capazes de pagar para a realização de testes rápidos para *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *E. coli* O157 e *E. coli*. e, como tal, determinar a gama de preços que é plausível para uma futura venda do kit Probe4Salmonella. Para todos os tipos de bactérias, o preço mais comum a pagar por cada ensaio varia de \$5-\$10, como é demonstrado na Figura 15. No entanto, alguns laboratórios (entre 16 e 25%), pagam mais do que \$ 20 por ensaio. Se os custos do Probe4Salmonella se situarem na gama dos 5-10 \$ por ensaio, podem ser facilmente adquiridos por laboratórios de microbiologia, traduzindo-se numa vantagem para a entrada deste kit no mercado.

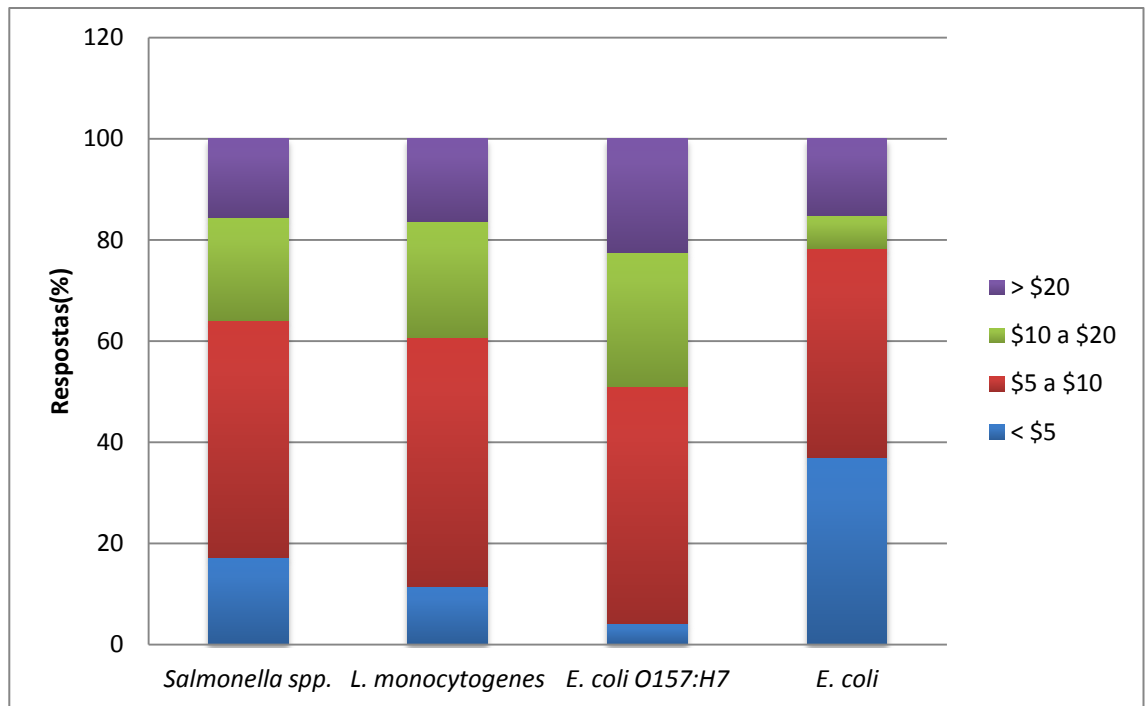


Figura 15: Percentagem do custo que cada laboratório paga por uma análise (*Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *E. coli* e *E. coli* O157) . Os valores do estudo (em dólares): < \$ 5, \$ 5-\$ 10, \$ 10 -\$ 20 ou > \$ 20.

- **Questão 7:** Se o preço for competitivo, estaria disposto a mudar para um novo teste rápido que permitisse resultados precisos para a deteção de patógenos alimentares no espaço de 24 horas?

Pela observação da Figura 16 pode-se concluir que a maioria dos laboratórios estaria disposta a utilizar um novo e rápido método, especialmente, se este for validado por um organismo internacional como AOAC ou AFNOR (63%). Embora na questão 1 a certificação não fosse considerado um fator chave, nesta análise, a certificação é essencial para a aceitação de novas metodologias de deteção de microrganismos, como é evidenciado na bibliografia [82]. Como é referido no Capítulo 3 a Biomode S.A. iniciou o processo de certificação do kit Probe4Salmonella. As respostas a este inquérito (tanto na Questão 1, como nesta) vêm reforçar a importância deste tipo de certificação, quer ao nível da credibilidade que este confere, bem como a necessidade desta para uma alteração dos métodos de deteção de microrganismos para estes laboratórios.

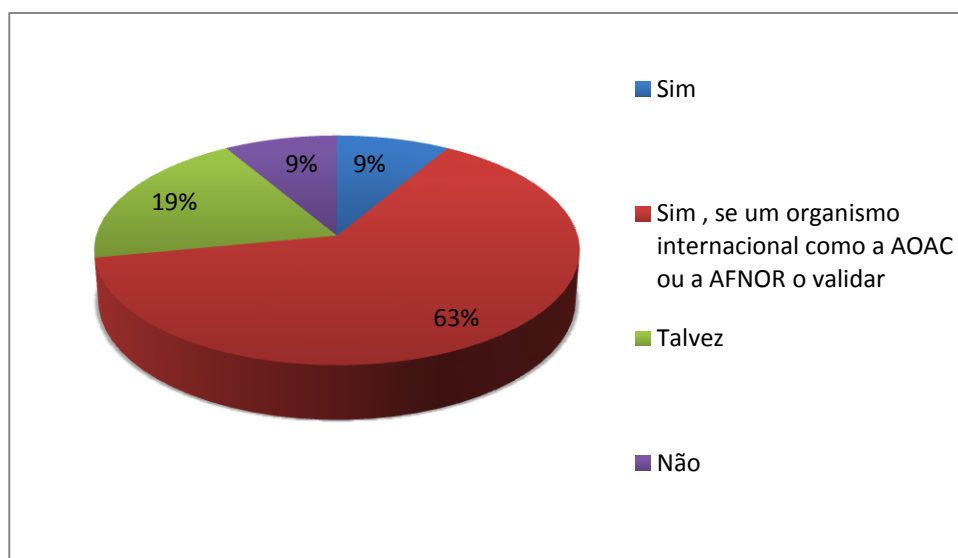


Figura 16: As respostas referentes a disponibilidade para mudarem para um novo método rápido. (em percentagem)

- **Questão 8:** Comentários adicionais

Neste parâmetro, foi proposto aos laboratórios, o fornecimento de mais informações que pudessem ser relevantes. Os laboratórios foram também convidados a indicar o país de origem. No entanto, apenas alguns laboratórios concederam este tipo de informações. Todas as respostas são exibidas no Anexo 2. Entre todas, três são comentários bastante pertinentes. Um deles é de um laboratório com base nos EUA que comunicou que não vai mudar as metodologias de análise, pois adquiriu recentemente o Método de Detecção Molecular 3M. Outro laboratório dos EUA estava disponível a pagar mais por um teste microbiológico para detecção de *L. monocytogenes* se este for tão bom quanto os métodos já validados pela AOAC ou como métodos de cultivo adotados pelo FDA, e se o tempo de ensaio for significativamente menor do que as 24 horas. Por fim, outro laboratório dos EUA defende que os fatores chave para um método de detecção de *Salmonella* spp. e *L. monocytogenes*, são o tempo e a validação credível (AOAC).

4.3 Correlação dos resultados mais relevantes para Biomode S.A., com a finalidade de uma melhor compreensão das necessidades do mercado.

Com vista ao mercado a Biomode S.A., tem de se concentrar nos 23% dos laboratórios que possuem microscópio de epifluorescência nas suas instalações, pois este é necessário para a observação dos resultados.

No Anexo 2 são apresentadas as tabelas com a correlação dos resultados nas questões sobre preço, volume de ensaios, o tempo e a disposição para alterar o seu método atual. A correlação destes fatores torna-se fulcral para a compreensão deste mercado. Assim proporciona o conhecimento para os passos que a Biomode SA tem de realizar para a penetração eficaz no mercado da deteção microbiológica.

Em geral, para todos os parâmetros que foram correlacionados, existe uma tendência de uniformidade para todos os microrganismos estudados.

Analisando a correlação entre os volumes de ensaio que os laboratórios realizam por mês para cada microrganismo, e a disponibilidade de mudança para uma técnica rápida de deteção (Tabela 1 do Anexo 2), pode-se concluir que pequenos laboratórios (<100 testes por mês) possuem maior capacidade para tal, se o novo método for validado pela AOAC ou AFNOR. Afigura-se que é mais difícil a implementação de um novo método para laboratórios com maior número ensaios por mês, devido à padronização dos seus métodos, e ao elevado investimento que acarreta esta alteração. Uma validação pela AOAC ou AFNOR é fundamental (60%) para tal suceder, pois esta concede um elevado nível de credibilidade.

Comparando os resultados das questões 5 e 6 (Tabela 2 do Anexo 2), verifica-se um aumento do tempo de deteção, com o aumento do custo por ensaio. Tais factos mostram que quanto mais tempo a deteção demorar, mais dinheiro os laboratórios cobram por ensaio. Esta correlação apoia a necessidade de métodos rápidos de deteção como o kit da Biomode SA, a fim de diminuir a quantidade de dinheiro que cada ensaio acarreta.

Os laboratórios que levam menos tempo para realizar os seus ensaios não são, necessariamente, os que têm maior número de ensaios por mês (Tabela 3 do Anexo 2). Assim, não existe uma uniformidade na utilização de métodos de deteção rápida de microrganismos e o tamanho dos laboratórios. O kit Probe4Salmonella vai melhorar a eficiência tanto dos pequenos como dos maiores laboratórios.

A quantidade de ensaios não influencia o custo do ensaio (Tabela 4 do Anexo 2). Provavelmente com um método mais rápido e simples (Probe4Salmonella), os ensaios ficarão mais baratos, o que pode significar mais ensaios por mês para os laboratórios microbiológicos.

4.4 Conclusão

Como conclusão, os fatores chave para a detecção de microrganismos são o custo, a especificidade e a sensibilidade do ensaio. O kit apresentado pela Biomode S.A. apresenta valores altos de especificidade e sensibilidade, já comprovados. Necessita de definir um custo de venda do kit Probe4Salmonella que se enquadre dentro do já aplicado a outros métodos de detecção rápida (5-10 \$). Para um laboratório decidir efetuar a mudança de métodos de detecção, há necessidade de este se tornar financeiramente compensatório, assim como ser alvo de certificação, para que este seja tão credível como o método tradicional já usado nas suas instalações. A duração da análise não parece ser crucial para a troca de métodos, embora seja importante.

Em princípio tudo leva a crer que um método rápido, que leva menos de 24 horas para dar um resultado, com implementação de baixo custo (tipo de equipamentos necessários e técnicos especializados), alta sensibilidade e especificidade que seja alvo de uma certificação por uma instituição credenciada, poderá revolucionar o mercado de detecção de microrganismos. O kit da Biomode S.A. enquadra-se dentro de todos estes parâmetros, logo tem a capacidade de tornar-se uma técnica inovadora e promissora para detetar microrganismos.

Capítulo 5-Certificação da empresa pela norma ISO 9001

5.1 Necessidade de certificação da empresa

O processo de certificação de um sistema de gestão de qualidade segundo a norma ISO 9001 é um processo voluntário de uma organização, com a finalidade de lhe ser reconhecida, por parte de uma entidade externa e independente, a execução dos requisitos exigidos pela norma do sistema de gestão da qualidade da organização auditada. A ISO é uma organização não-governamental, fundada em 1947 pela Agência das nações Unidas. Ela é composta por representantes de mais de 90 países incluindo o British Standards Institution (BSI) e o American National Standards Institute (ANSI), e os seus membros fazem a ponte entre os requisitos do negócio e as necessidades dos consumidores e utilizadores. Alguns dos seus membros fazem parte de estruturas governamentais dos seus próprios países enquanto outros membros vêm do sector privado [90].

A família de normas ISO 9000 foi publicada pela primeira vez em 1987. Desde então estas normas foram sujeitas a três revisões nos anos de 1994, 2000 e 2008. Atualmente a família de normas ISO 9000 é composta por três normas: a ISO 9000:2005 que engloba os fundamentos e vocabulário a aplicar em sistemas de controlo de qualidade; a ISO 9001:2008 que especifica os requisitos necessários para a aplicação de um sistema de controlo de qualidade; e por último a ISO 9004:2009 que constitui um guia para o desenvolvimento do sistema de controlo de qualidade e para o melhoramento contínuo do mesmo [90].

A ISO 9001 permite facilitar o negócio internacional, criando, nesse sentido, um referencial de qualidade que pode ser adotado por todas as empresas, independentemente do sector de atividade e países de origem, sendo o objetivo principal a satisfação do cliente. Com a implementação da ISO 9001 alcançam-se novos mercados e também se faz a manutenção dos existentes, pois aumenta-se a confiança externa e interna nos métodos de trabalho. A reorganização da empresa é favorecida, assim como o aumento da motivação dos colaboradores. Existe uma redução de inconformidades e consequentemente um maior controlo de custos. Esta norma tem um reconhecimento quase mundial e permite a integração na lista de empresas líderes no mundo [91].

A implementação e a certificação de sistemas de gestão da qualidade são consideradas das práticas de gestão da qualidade mais populares e mais usadas desde finais do século passado. Em 2006, a barreira das 900 mil empresas certificadas foi ultrapassada a nível mundial, destacando-se 3 países que representam 38,8% dos certificados ISO9001 emitidos mundialmente [92]. A China aparece com 162.259 certificados emitidos, a Itália com 105.799 e o Japão com 80.159 certificados. Na Figura 17 representa-se o número de certificados ISO 9001 desde 2001 a 2006, a uma escala mundial.

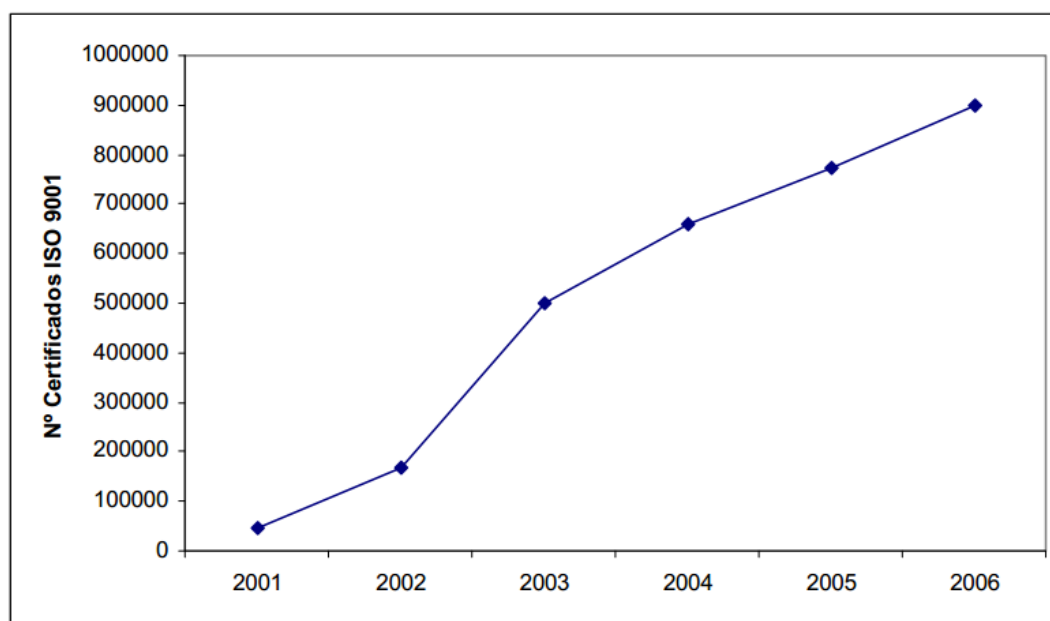


Figura 17: Número de certificados ISO 9001 ao longo dos anos a uma escala mundial [92].

Em 2006, Portugal apresentava 5.851 certificados ISO 9001 emitidos [92], representando apenas 0,65% do número total de certificados mundialmente emitidos. Na Figura 18 representa-se a evolução deste parâmetro a nível nacional.

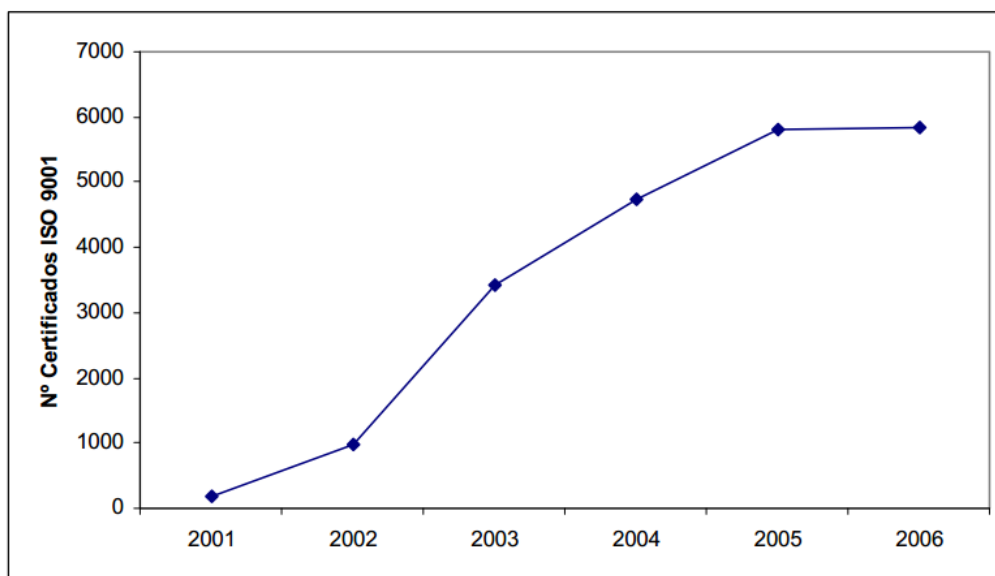


Figura 18: Número de certificados ISO 9001 aos longos dos anos a nível nacional [92].

No mesmo ano operavam em Portugal 11 entidades no âmbito da certificação de sistemas de gestão da qualidade, destacando-se a Empresa Internacional de Certificação (EIC), Associação Portuguesa de Certificação (APCER) e Sociedade Geral de Superintendência (SGS) [93].

A implementação da ISO 9001 surge em resposta a necessidades internas e/ou externas das empresas, de apresentar e certificar o seu sistema de gestão da qualidade, como é referido de forma unânime na bibliografia. As necessidades internas estão relacionadas com o alcançar de uma efetiva melhoria organizacional interna. As externas baseiam-se fundamentalmente em aspetos de marketing, promocionais e de melhoria de imagem externa [94-101]. No trabalho realizado por Jones et al. (1997), os autores definiram dois grupos de empresas. As empresas não desenvolvidas, em que a necessidade de certificação se prende, principalmente por motivos comerciais, e as empresas desenvolvidas, que avançam para a implementação de um sistema de gestão da qualidade com o intuito de obterem benefícios principalmente de natureza interna [95].

Magd e Curry (2003), conduziram um estudo ao nível das empresas egípcias, constatando que fatores como, melhoria da eficiência do sistema da qualidade, pressões pelo facto das principais empresas concorrentes já se encontrarem certificadas, manutenção ou aumento da quota de mercado, cumprimento de exigências

governamentais e pressões por parte dos principais clientes foram as principais razões que levaram estas empresas à certificação [101]. Outro aspeto normalmente referido na bibliografia é o facto das empresas sem certificação ISO 9001 não conseguirem ganhar a maioria dos seus concursos [99].

Como já foi referido, esta norma tem origem europeia. Consequentemente existe um maior número de empresas certificadas pela mesma, neste continente. Como tal, é necessário destacar que as principais motivações das empresas americanas para se certificarem por esta norma, devem-se às relações comerciais com empresas europeias, sendo a certificação ISO 9001 um requisito frequentemente exigido por parte destas [102]. A maioria dos investigadores conclui que existem apenas estes dois grandes tipos de motivações (internos e externos) para a certificação ISO 9001. Contudo, Llopis e Tarí (2003) destacam uma terceira, os requisitos dos clientes. Esta última categoria engloba todas aquelas empresas em que os seus clientes demandam a certificação. Os autores concluíram que a motivação externa era a mais importante para as empresas analisadas [100].

Assim como na categoria das motivações, os benefícios resultantes da certificação ISO 9001 também se podem dividir em 2 grupos, benefícios internos e externos. Os benefícios internos resumem-se à obtenção de melhorias organizacionais internas. Por outro lado, os benefícios externos passam pela obtenção de melhorias a nível de marketing, aspetos promocionais, melhoria da imagem da empresa, entre outros [91, 94, 96, 97, 99, 101, 103, 104].

Os benefícios quer internos, quer externos encontram-se sumariados na Tabela 11. Leung et al. (1999) e Escanciano et al. (2001) verificaram que os benefícios resultantes da certificação superaram os custos associados à mesma [103, 104].

Tabela 11: Resumo dos benefícios internos e externos conferidos pela norma ISO 9001 [105].

Benefícios Externos	Benefícios Internos
Acesso a novos mercados	Aumentos de produtividade
Melhoria da imagem da empresa	Maior consciencialização para o conceito da qualidade
Aumento da quota de mercado	Clarificação de responsabilidades e Obrigações
Ferramenta de marketing	Melhorias a nível dos prazos de entrega
Melhoria da relação com os clientes	Melhorias organizacionais internas
Aumento da satisfação dos clientes	Diminuição das não conformidades
Melhoria na comunicação com o cliente	Diminuição do número de reclamações
	Melhoria na comunicação interna
	Melhorias na qualidade dos produtos
	Vantagens competitivas
	Motivação dos colaboradores

Um dos obstáculos à certificação segundo a norma ISO 9001, frequentemente, citado na bibliografia está relacionado com a falta de envolvimento de gestão de topo no processo de implementação e certificação do sistema de gestão da qualidade, tornando-se este um fator crítico no sucesso da certificação ISO 9001 [91, 97, 99]. Podem-se encontrar outros obstáculos à certificação ISO 9001 na literatura científica como, os custos elevados de implementação e manutenção do sistema de gestão da qualidade (SGQ), a falta de conhecimento específico por parte dos auditores relativamente aos sectores a serem auditados. Existe um excessivo suporte ao nível da documentação, assim como diferentes interpretações para os mesmos aspetos da norma. Também se podem destacar fatores como a falta de ética das entidades certificadoras, restrições de recursos humanos, financeiros e materiais, principalmente a nível das pequenas e médias empresas [97, 103].

Destaca-se como aspeto negativo associado à certificação ISO 9001, o facto de a motivação “pressão por parte de clientes” ser uma das mais frequentes razões para a implementação da certificação. Para muitas organizações a certificação ISO 9001 é efetuada por imposição dos clientes, particularmente grandes empresas, em que, por vezes, elas próprias não possuem sistemas de gestão da qualidade certificados [97, 99].

5.2 Requisitos

A norma ISO 9001 divide-se em 9 capítulos como é descrito na Tabela 11 em que os 4 primeiros têm um carácter introdutório. Os capítulos seguintes são referentes aos requisitos necessários para a implementação da norma e serão explicados de seguida.

Tabela 11: Os capítulos da norma ISO 9001 e um breve resumo dos mesmos.

Capítulo	Função
Introdução	-
Campo de aplicação	Objetivos da norma e o campo de aplicação da mesma
Referências normativas	Referência às normas complementares à ISO 9001 para uma correta implementação desta certificação
Termos e definições	Referência à ISO 9000:2005 como a base de todos os termos e definições usados na ISO 9001:2008
Sistema de gestão de qualidade	Explica a necessidade de implementação de um sistema de garantia de qualidade do processo e fornece diretrizes gerais para que sistematicamente se conduza e opere uma organização, a fim de melhorar continuamente o seu desempenho, indicando as informações e evidências necessárias para a eficácia e eficiência
Responsabilidade da gestão	Estabelecimento da política de qualidade e dos objetivos da qualidade e a avaliação e melhoria do SGQ
Gestão de recursos	Garantir a implementação, manutenção e a melhoria contínua do SGQ por meio de provisão de recursos financeiros, humanos e de infraestrutura
Realização do produto	Realçar os processos relacionados com a realização do produto e a documentação dos mesmos
Medição análise e melhoria	Demonstrar a importância da medição do desempenho para a tomada de decisão com base em factos e dados. Assegurar que as medições são eficazes para garantir a melhoria do desempenho da organização e melhoria da satisfação dos clientes

O sistema de gestão de qualidade apresenta requisitos gerais assim como de documentação. Os primeiros englobam a identificação dos processos necessários e determinação das interações entre eles. Aqui insere-se também a definição dos critérios e métodos para garantir a eficácia desses processos, assim como assegurar a disponibilidade dos recursos necessários e monitorização, medição e análise dos mesmos. Consequentemente é garantida a implementação das ações necessárias para atingir os resultados esperados e melhoria contínua dos mesmos. Os segundos agregam a declaração documentada da política de qualidade e dos objetivos de qualidade, manual de qualidade, assim como os procedimentos documentados requeridos pela norma e os necessários para a organização (procedimentos, instruções e registos) [106].

O segmento responsabilidade de gestão apela a 5 requisitos. No comprometimento da direção é demonstrada a responsabilidade no desenvolvimento, implementação e melhoria do SGQ; O foco no cliente em que os seus requisitos são entendidos e atendidos com a finalidade do aumento da satisfação do mesmo; A política de qualidade que deve estar de acordo com a missão e objetivos da empresa e tem de ser comunicada e analisada por todos; O planeamento onde se definem os objetivos de qualidade, os quais devem ser mensuráveis e consistentes com a política de qualidade; O SGQ é planeado de forma a atender aos objetivos da qualidade e dos requisitos gerais; Os requisitos da responsabilidade, autoridade e comunicação fazem com que seja nomeado um representante da direção responsável por assegurar a implementação do SGQ, e garantir a comunicação interna em toda a organização; A análise crítica pela direção visa um estudo crítico do SGQ periódico com a finalidade de assegurar a sua adequação, eficácia e melhoria [105].

A secção de gestão de recursos envolve a provisão de recursos necessários para implementar, manter e melhorar o SGQ e satisfação do cliente. Estes recursos englobam recursos humanos, infraestruturas e ambiente de trabalho. O primeiro tem em conta o pessoal que executa atividades que afetam a qualidade do produto. Este deve ser competente com base em formação, preparação, habilidades e experiências. O segundo assegura o fornecimento e manutenção de infraestruturas necessárias (prédios, instalações, equipamentos, softwares, serviços de apoio, etc.) para a implementação do SGQ. O terceiro determina a gestão das condições necessárias no ambiente de trabalho para se atingir a conformidade dos requisitos do produto [107, 108].

A categoria realização do produto oferece estruturas necessárias para que as operações da organização atinjam os resultados esperados, reforçando a abordagem do processo, incluindo requisitos que vão desde o entendimento das necessidades e expectativas dos clientes e o desenvolvimento do produto, processo de aquisição, produção e fornecimento de serviços, até o controle de dispositivos de medição e monitorização [107, 108].

O grupo medição análise e melhoria apresenta os requisitos gerais, para a medição e monitorização, análise de dados, controle do produto não conforme e melhorias. Nos requisitos gerais aborda-se planeamento e implementação dos processos de monitorização, medição, análise e melhoria para demonstrar a conformidade do produto, assegurar a conformidade de SGQ e a melhoria contínua do mesmo. Na medição e monitorização controlam-se processos e produtos assim como informações relativas à satisfação dos clientes e à realização de auditorias internas do SGQ, periodicamente. No controle do produto não conforme, assegura-se que os produtos não conformes sejam identificados e controlados, para evitar o seu uso ou entrega não intencional. Na análise de dados colectam-se dados referentes à satisfação do cliente, conformidade do produto, características e tendências dos processos e fornecedores, a fim de avaliar a adequação, eficácia e melhoria contínua de SGQ. O último requisito promove a melhoria contínua do SGQ por meio de uso da política de qualidade, dos objetivos da qualidade, dos resultados das auditorias, das análises de dados e das ações correctivas e preventivas [107, 108].

5.3 Resultados e discussão

Para satisfazer necessidades quer internas quer externas, a Biomode, S.A. está a implementar um processo de certificação baseado na norma ISO 9001. A empresa procura benefícios internos e externos com a realização deste processo. Para auxiliar na implementação da norma, a Biomode, S.A. contratou a empresa QualiWeb. Esta é uma empresa online, subsidiária da empresa mãe Qualimeta Servicios Empresariales, S.L., sediada em Pontevedra, Espanha. A QualiWeb presta vários serviços na área da qualidade em que um dos ramos do seu negócio é a implementação de Sistemas de Gestão, nomeadamente o SGQ baseado na norma ISO 9001. Este processo teve início em Março de 2012 e obedeceu à calendarização da Tabela 12. Aquando do início deste estágio, este processo já se encontrava a ser desenvolvido, onde já tinham sido redigidos

documentos necessários ao sistema documental do SGQ. Estes documentos agruparam-se no sistema de Documentação e Registos e referem-se ao Manual da Qualidade, Manual de Processos, Manual de Funções, Procedimentos de Qualidade (PQ), Procedimentos Operacionais (PO), Procedimentos de Ensaio (PE), Instruções de Trabalho (IT), Documentos de Suporte (DS) e Impressos/Registos (IR). Estes documentos encontram-se em formato digital para se obter uma edição e melhoramento mais rápido e eficaz.

Perante a implementação da ISO 9001 este estágio que se iniciou em Setembro de 2012, focou-se na preparação de todo o processo até a produção. Foram definidos os objetivos de qualidade (Anexo 3), traçando-se metas a serem atingidas a curto e a longo prazo. Estas são mensuráveis e consistentes com a política de qualidade.

Tabela 12: Calendarização da implementação da ISO 9001 na Biomode S.A.

Fases	Meses													
	03/12	06/12 - 12/12							01/13 - 06/13			07/13	08/13	
Diagnóstico/Sensibilização														
Apoio na identificação da estrutura de processos da BIOMODE SA														
Elaboração Sistema Documental do SGQ														
Acompanhamento da implementação														
Instrução processo para entidade Certificadora														
Resposta Auditoria Interna														
Resposta Auditoria Certificação														

A Biomode S.A. decidiu realizar a produção das soluções dos kits necessários para a certificação pela AOAC nas suas instalações, subcontratando uma empresa para realizar o enchimento dos frascos dos kits (como foi referido no Capítulo 3). Neste estágio com inserção no grupo responsável pela produção destas soluções desenvolveram-se várias atividades: 1) Preparação destas soluções que teve de obedecer aos parâmetros definidos nos certificados de qualidade (Anexo 6). 2) Realização de um dossiê de Lote (Anexo 4) onde são definidos os números de lote, para cada solução e registados todos os volumes e massas medidos, para todos os reagentes das soluções.

Consequentemente, deste modo conseguiu-se definir um processo de rastreabilidade na eventualidade de algum problema com alguma solução do kit. Isto permite que facilmente através da identificação do número de lote, se retirem de circulação esses mesmos reagentes ou soluções, que eventualmente poderão conter alguma anomalia. Este processo permite a melhoria da garantia de qualidade dos produtos da Biomode SA, refletindo-se na melhoria da satisfação dos clientes [94].

Foram elaboradas as fichas de dados de segurança do material (MSDS) (Anexo 5) e os certificados de qualidade de cada solução do kit (Anexo 6). O principal documento que delineia os princípios da realização das MSDS na União Europeia é o Regulamento (CE) n.º 1907/2006 do Parlamento e do Conselho de 18 de Dezembro de 2006. Neste documento, o artigo 31º especifica os casos em que é necessário o fornecedor de um produto facultar ao destinatário a ficha MSDS. Os casos são os seguintes:

- A substância ou preparação em causa cumpra os critérios para a sua classificação como perigosa nos termos das Diretivas 67/548/CEE ou 1999/45/CE, ou
- A substância em causa seja persistente, bioacumulável e tóxica ou muito persistente e muito bioacumulável, de acordo com os critérios estabelecidos no Anexo XIII do Regulamento (CE) n.º 1907/2006, ou
- A substância em causa esteja incluída na lista estabelecida nos termos do n.º1 do artigo 59º do Regulamento (CE) n.º 1907/2006, por outros motivos não os invocados nas alíneas anteriores.

O kit Probe4Salmonella contém várias substâncias que são classificadas como perigosas, nomeadamente o 4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl) phenyl-polyethylene glycol, o tris base o paraformaldeído, o etanol e a formamida. Todos os reagentes constituintes do kit provêm da Sigma-Aldrich® (Espanha), à exceção do etanol (José Manuel Gomes dos Santos, Portugal) e da sonda (Panagene, Coreia do Sul). Assim, neste estágio fez-se a realização das fichas MSDS para cada solução do kit. A empresa responsável pelo enchimento dos kits pediu, como requisito, a apresentação das fichas MSDS e dos certificados de qualidade para cada solução. Estes serão documentos importantes aquando da comercialização do kit. Para a realização das fichas MSDS a Biomode S.A. cumpriu os requisitos constantes no anexo II do Regulamento (CE) n.º 1907/2006. Os

certificados de qualidade permitem garantir que todas as soluções finais do kit contenham todos os reagentes, dentro do que foi estipulado para cada solução.

Após o término da certificação AOAC a que está a ser alvo o kit Probe4Salmonella (Capítulo 3), a Biomode S.A. decidiu que irá subcontratar uma empresa para realizar todos os processos referentes à produção dos kits. Consequentemente, tornou-se fulcral redigir um documento referente à produção do kit (Anexo 7) pelo que neste trabalho se fez a sua preparação. Este reúne toda a informação pormenorizada para a produção de 1 lote de kits (60 kits). Este documento, além de compilar todos os reagentes e respetivas quantidades de cada solução do kit, contém também todos os pormenores que se deve ter em conta aquando da produção de cada solução do kit. Assim, são fornecidas à empresa subcontratada todas as informações para que se mantenha a qualidade da produção do kit Probe4Salmonella. Este documento contribuirá para a diminuição das não conformidades, redução das reclamações, maior consciencialização para o conceito da qualidade e clarificação de responsabilidades e obrigações. Resumidamente, aumentará a produtividade, com garantia da qualidade [103].

A etiquetagem de todos os equipamentos do laboratório da Biomode S.A (balança, estufas, micropipetas, microscópio entre outros) (Anexo 8) foi outra das tarefas deste estágio. Esta etiquetagem será útil sempre que houver uma avaria, já que a cada equipamento é fornecido um código. Cada código está inserido no manual de Registos. Este engloba tanto a informação sobre o equipamento, bem como todo o historial desse equipamento na Biomode S.A. (calibrações, verificações manutenções internas e ocorrências). Deste modo, melhorou-se a organização interna da empresa, facilitando a comunicação interna e por consequência irá refletir-se no aumento da produtividade [103].

Tendo em conta que o mercado da Biomode S.A. é mundial foi necessário que tanto as fichas MSDS, os certificados de qualidade, como documento referente à produção estivessem disponíveis em português e em inglês. Neste trabalho fez-se a redação destes documentos, e ainda a tradução dos mesmos, para que existam nestes dois formatos. O folheto informativo já existia em português, pelo que realizei a tradução do mesmo para inglês (Anexo 9).

O processo de implementação da ISO 9001 só poderá estar concluído quando o produto final certificado entrar no mercado e se obtiver informação das vendas. Esta informação será relevante e será necessário integra-la na certificação ISO 9001, com a finalidade de obter dados referentes aos requisitos de clientes. Só assim se poderá finalizar todos os aspetos referentes ao produto e fazer a medição de análise e melhoria da qualidade [107, 108], para que se possa realizar a auditoria com o intuito de verificar a correta implementação da norma, como demonstrado na Tabela 12. Este atraso na implementação da ISO 9001 deve-se ao facto de a Biomode SA ser uma empresa nova e por consequência, estar a lidar com todos estes processos pela primeira vez, implicando aprendizagem na aplicação dos mesmos. Estes factos justificam a ocorrência de alguns atrasos ao nível da produção e certificação do kit.

6. Conclusão

Este trabalho na empresa Biomode S.A. incluiu 3 áreas distintas: a certificação do kit Probe4Salmonella e da empresa em si, a otimização do método de PNA FISH para a deteção rápida de *L. monocytogenes* e a análise do mercado de deteção microbiológica para a área agroalimentar, no formato de um inquérito.

A otimização do método de PNA FISH para a deteção de *L. monocytogenes* em leite foi concluído. Este método foi comparado com o método tradicional de cultura (segundo a ISO11290:2004), tendo-se obtido resultados concordantes. Assim a técnica de PNA FISH poderá ser uma alternativa viável aos métodos tradicionais, sendo mais rápida e menos trabalhosa que esta. Este tipo de vantagens irá facilitar a sua aceitação. Neste trabalho, este método otimizado, foi apenas testado numa matriz, pelo que será necessário, de futuro, realizar testes abrangendo outras matrizes, para se poder provar a eficácia deste método.

O trabalho da certificação AOAC do kit Probe4Salmonella foi iniciado e encontra-se no final da fase de consultadoria. Esta certificação demorará cerca de 4 a 6 meses a ser concedida. A Biomode S.A. possui outros produtos desenvolvidos na área alimentar (kit para a deteção de *E. coli* e de *E. coli* O157). Após o término da certificação do kit Probe4Salmonella, irá proceder-se à certificação destes, pois há a necessidade de conferir credibilidade à deteção antes dos kits entrarem no mercado.

A implementação da ISO 9001 na Biomode S.A. encontra-se completamente estabelecida até à fase de produção. Para se concluir este processo torna-se fulcral a Biomode S.A. comercializar os seus produtos, por ser necessário conhecer-se os requisitos dos clientes para completar a documentação em falta. Visto que a Biomode S.A. pretende só comercializar o seu primeiro produto após a conclusão da certificação AOAC, apenas com a finalização da certificação deste, se poderá concluir o processo de certificação da empresa pela norma ISO 9001.

O inquérito permitiu concluir que o mercado de deteção microbiológica necessita de métodos rápidos (deteção em menos de 24 horas), com uma implementação de baixo custo (tipo de equipamentos necessários, técnicos especializados), alta sensibilidade e especificidade e alvo de uma certificação por

uma instituição credenciada, como a AOAC ou a AFNOR. Os produtos da Biomode S.A. inserem-se dentro destas características, o que fará com que os seus produtos sejam comercializados com sucesso.

Bibliografia

1. IFT Expert Report on Emerging Microbiological Food Safety Issues 2002 28/11/12]; Available from: http://members.ift.org/IFT/Research/IFTExpertReports/microsfs_report.htm.
2. Hedberg, C., *Food-related illness and death in the United States*. Emerging Infectious Diseases, 1999. **5**(6): p. 840-841.
3. EFSA, *The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010*. EFSA Journal, 2012. **10**(3): p. 2597.
4. WHO. *Five keys to safer food manual*. 2006 28/11/12]; Available from: http://www.who.int/entity/foodsafety/publications/consumer/manual_keys.pdf.
5. Forsythe, S.J., *Microbiologia da segurança alimentar* 2002, Porto Alegre: artmed.
6. Bibek, R., *Fundamental food microbiology* 2001, Londres: Fourth Edition.
7. Jay, S., Diane, D., Dundas, M., Frankish, E., & Lightfoot, D., *Foodborne microorganisms of public health significance*. 6 ed 2003, Waterloo, NSW, Australia: Australian Institute of Food Science and Technology Inc.
8. (CDC), C.f.D.C. *Salmonella surveillance: annual summary*. 2006 [cited 05/12/12; Available from: <http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/phlisdata/salmtab/2006/SalmonellaIntroduction2006.pdf>.
9. Bremer, P.J., Fletcher, G. C., & Osborne, C. . *Salmonella in seafood*. 2003 28/11/12]; Available from: <http://www.crop.cri.nz/home/research/marine/pathogens/Salmonella.pdfLast>.
10. Ryser, E.T.a.M., E.H, *Listeria, Listeriosis, and Food Safety* 1999, Nova Iorque: Marcel Dekker Inc.
11. Gandhi, M. and M.L. Chikindas, *Listeria: A foodborne pathogen that knows how to survive*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **113**(1): p. 1-15.
12. Schlech, W.F., *Epidemic listeriosis - evidence for transmission by food*. New England Journal of Medicine, 1983. **308**(4): p. 203-206.
13. Lopez, J. *Listeria monocytogenes*, in: *OIE*. 2008 28/11/12]; Available from: www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.07_LISTERIA_MONO.pdf.
14. J, R.J.B., *Foodborne listeriosis*. World Health Stat, 1997: p. 67-73.
15. Amann, R., B.M. Fuchs, and S. Behrens, *The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation*. Current Opinion in Biotechnology, 2001. **12**(3): p. 231-236.
16. Almeida, G.N., *Listeriosis in Portugal: an existing but under reported infection*. BMC Infectious Diseases, 2006. **6**(1): p. 153.
17. B, S., *Listeria monocytogenes*. In: *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 2 ed 2001, Washington, DC: Doyle M.P., Beuchat L.R. & Montville T.J., eds. ASM Press.
18. McLauchlin, J., *Listeria monocytogenes and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods*. International Journal of Food Microbiology, 2004. **92**(1): p. 15-33.
19. Yang, H., *Rapid detection of Listeria monocytogenes by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR*. International Journal of Food Microbiology, 2007. **118**(2): p. 132-138.
20. Ingiani, A., *Rapid detection of Listeria monocytogenes in foods, by a combination of PCR and DNA probe*. Molecular and Cellular Probes, 2001. **15**(5): p. 275-280.
21. Stephan, R., S. Schumacher, and M.A. Zychowska, *The VIT (R) technology for rapid detection of Listeria monocytogenes and other Listeria spp.* International Journal of Food Microbiology, 2003. **89**(2-3): p. 287-290.

22. Aycicek, H., *Assessment of the bacterial contamination on hands of hospital food handlers*. Food Control, 2004. **15**(4): p. 253-259.
23. Sanders, S.Q., *Culture and detection of Campylobacter jejuni within mixed microbial populations of biofilms on stainless steel*. Journal of Food Protection, 2007. **70**(6): p. 1379-1385.
24. Gasanov, U., D. Hughes, and P.M. Hansbro, *Methods for the isolation and identification of Listeria spp. and Listeria monocytogenes: a review*. Fems Microbiology Reviews, 2005. **29**(5): p. 851-875.
25. Frece, J., *Comparison of conventional and molecular methods for the routine confirmation of Listeria monocytogenes in milk products produced domestically in Croatia*. Journal of Dairy Research, 2010. **77**(1): p. 112-116.
26. Jadhav, S., M. Bhawe, and E.A. Palombo, *Methods used for the detection and subtyping of Listeria monocytogenes*. Journal of Microbiological Methods, 2012. **88**(3): p. 327-341.
27. Brehm-Stecher, B.F., Johnson, E.A, *Listeria, Listeriosis and Food Safety* 2007, Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group.
28. Zhang, D., *Simultaneous detection of Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Salmonella enterica and Escherichia coli o157:h7 in food samples using multiplex PCR method*. Journal of Food Safety, 2009. **29**(3): p. 348-363.
29. Aznar, R. and B. Alarcon, *On the specificity of PCR detection of Listeria monocytogenes in food: a comparison of published primers*. Systematic and Applied Microbiology, 2002. **25**(1): p. 109-119.
30. Shearer, A.E.H., C.M. Strapp, and R.D. Joerger, *Evaluation of a polymerase chain reaction-based system for detection of Salmonella enteritidis, Escherichia coli O157 : H7, Listeria spp., and Listeria monocytogenes on fresh fruits and vegetables*. Journal of Food Protection, 2001. **64**(6): p. 788-795.
31. Kaclikova, E., *Detection of Listeria monocytogenes in food, equivalent to EN ISO 11290-1 or ISO 10560, by a three-days polymerase chain reaction-based method*. Food Control, 2003. **14**(3): p. 175-179.
32. Lei, I.F., *Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens*. Journal of Food and Drug Analysis, 2008. **16**(4): p. 37-43.
33. Wan, J., *Detection of Listeria monocytogenes in salmon using the probelias polymerase chain reaction system*. Journal of Food Protection, 2003. **66**(3): p. 436-440.
34. Jung, Y.S., *Polymerase chain reaction detection of Listeria monocytogenes on frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB*. Journal of Food Protection, 2003. **66**(2): p. 237-241.
35. Norton, D.M., *Molecular studies on the ecology of Listeria monocytogenes in the smoked fish processing industry*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(1): p. 198-205.
36. Thimothe, J., *Tracking of Listeria monocytogenes in smoked fish processing plants*. Journal of Food Protection, 2004. **67**(2): p. 328-341.
37. D'Agostino, M., *A validated PCR-based method to detect Listeria monocytogenes using raw milk as a food model - Towards an international standard*. Journal of Food Protection, 2004. **67**(8): p. 1646-1655.
38. Silbernagel, K., *Evaluation of the BAX (R) system for detection of Listeria monocytogenes in foods: Collaborative study*. Journal of Aoac International, 2004. **87**(2): p. 395-410.
39. Choi, W.S. and C.H. Hong, *Rapid enumeration of Listeria monocytogenes in milk using competitive PCR*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **84**(1): p. 79-85.
40. Koo, K. and L.A. Jaykus, *Detection of Listeria monocytogenes from a model food by fluorescence resonance energy transfer-based PCR with an asymmetric fluorogenic probe set*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. **69**(2): p. 1082-1088.

41. Rodriguez-Lazaro, D., M. Hernandez, and M. Pla, *Simultaneous quantitative detection of Listeria spp. and Listeria monocytogenes using a duplex real-time PCR-based assay*. Fems Microbiology Letters, 2004. **233**(2): p. 257-267.
42. Rodriguez-Lazaro, D., *Quantitative detection of Listeria monocytogenes and Listeria innocua by real-time PCR: Assessment of hly, iap, and lin02483 targets and AmpliFluor technology*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. **70**(3): p. 1366-1377.
43. Bhagwat, A.A., *Simultaneous detection of Escherichia coli O157 : H7, Listeria monocytogenes and Salmonella strains by real-time PCR*. International Journal of Food Microbiology, 2003. **84**(2): p. 217-224.
44. Hough, A.J., *Rapid enumeration of Listeria monocytogenes in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction*. Journal of Food Protection, 2002. **65**(8): p. 1329-1332.
45. Dunbar, S.A., *Quantitative, multiplexed detection of bacterial pathogens: DNA and protein applications of the Luminex LabMAP (TM) system*. Journal of Microbiological Methods, 2003. **53**(2): p. 245-252.
46. Volokhov, D., *Identification of Listeria species by microarray-based assay*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(12): p. 4720-4728.
47. Klein, P.G. and V.K. Juneja, *Sensitive detection of viable Listeria monocytogenes by reverse transcription-PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 1997. **63**(11): p. 4441-4448.
48. Ootsubo, M., *Seven-hour fluorescence in situ hybridization technique for enumeration of Enterobacteriaceae in food and environmental water sample*. Journal of Applied Microbiology, 2003. **95**(6): p. 1182-1190.
49. Moter, A. and U.B. Gobel, *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms*. Journal of Microbiological Methods, 2000. **41**(2): p. 85-112.
50. Amann, R.L., L. Krumholz, and D.A. Stahl, *Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental-studies in microbiology*. Journal of Bacteriology, 1990. **172**(2): p. 762-770.
51. Amann, R. and B.M. Fuchs, *Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques*. Nature Reviews Microbiology, 2008. **6**(5): p. 339-348.
52. Silverman, A.P. and E.T. Kool, *Oligonucleotide probes for RNA-targeted fluorescence in situ hybridization*, in *Advances in Clinical Chemistry, Vol 43*, G.S. Makowski, Editor 2007, Elsevier Academic Press Inc: San Diego. p. 79-115.
53. Cerqueira, L., et al., *DNA Mimics for the Rapid Identification of Microorganisms by Fluorescence in situ Hybridization (FISH)*. International Journal of Molecular Sciences, 2008. **9**(10): p. 1944-1960.
54. Wagner, M., *In situ detection of a virulence factor mRNA and 16S rRNA in Listeria monocytogenes*. Fems Microbiology Letters, 1998. **160**(1): p. 159-168.
55. Yilmaz, L.S., H.E. Okten, and D.R. Noguera, *Making all parts of the 16S rRNA of Escherichia coli accessible in situ to single DNA oligonucleotides*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(1): p. 733-744.
56. Shakeel, S., S. Karim, and A. Ali, *Peptide nucleic acid (PNA) - a review*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2006. **81**(6): p. 892-899.
57. Yazbeck, D.R., K.L. Min, and M.J. Damha, *Molecular requirements for degradation of a modified sense RNA strand by Escherichia coli ribonuclease H1*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(14): p. 3015-3025.
58. Cummins, L.L.O., S.R.; Risen, L.M.; Lesnik, E.A.; Freier, S.M.; McGee, D.; Guinasso, C.J.; Cook, P.D. , *Characterization of fully 2'-modified oligoribonucleotide heteroduplex and homoduplex hybridization and nuclease sensitivity* Nucleic Acids Res. , 1995: p. 2019-2024.

59. Margo, C.E. and T. Bombardier, *The diagnostic-value of fungal autofluorescence*. Survey of Ophthalmology, 1985. **29**(5): p. 374-376.
60. Graham, A.R., *Fungal autofluorescence with ultraviolet illumination*. American Journal of Clinical Pathology, 1983. **79**(2): p. 231-234.
61. Bhatia, U., K. Robison, and W. Gilbert, *Dealing with database explosion: A cautionary note*. Science, 1997. **276**(5319): p. 1724-1725.
62. Delong, E.F., G.S. Wickham, and N.R. Pace, *Phylogenetic stains - ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells*. Science, 1989. **243**(4896): p. 1360-1363.
63. Perry-O'Keefe, H., *Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method*. Journal of Microbiological Methods, 2001. **47**(3): p. 281-292.
64. Egholm, M., *PNA hybridizes to complementary oligonucleotides obeying the Watson-Crick hydrogen-bonding rules*. Nature, 1993. **365**(6446): p. 566-568.
65. Nielsen, P.E., *Sequence-selective recognition of dna by strand displacement with a thymine-substituted polyamide*. Science, 1991. **254**(5037): p. 1497-1500.
66. Perry-O'Keefe, H., *Filter-based RNA in situ hybridization for rapid detection, identification and enumeration of specific micro-organisms*. Journal of Applied Microbiology, 2001. **90**(2): p. 180-189.
67. Lomakin, A. and M.D. Frank-Kamenetskii, *A theoretical analysis of specificity of nucleic acid interactions with oligonucleotides and peptide nucleic acids (PNAs)*. Journal of Molecular Biology, 1998. **276**(1): p. 57-70.
68. Orum, H., *Sequence-specific purification of nucleic-acids by PNA-controlled hybrid selection*. Biotechniques, 1995. **19**(3): p. 472-480.
69. Fuchs, B.M., *In situ accessibility of Escherichia coli 23S rRNA to fluorescently labeled oligonucleotide probes*. Applied and Environmental Microbiology, 2001. **67**(2): p. 961-968.
70. Fuchs, B.M., *Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(12): p. 4973-4982.
71. Stender, H., *PNA for rapid microbiology*. Journal of Microbiological Methods, 2002. **48**(1): p. 1-17.
72. Demidov, V.V., *Stability of peptide nucleic-acids in human serum and cellular-extracts*. Biochemical Pharmacology, 1994. **48**(6): p. 1310-1313.
73. Wilks, S.A. and C.W. Keevil, *Targeting species-specific low-affinity 16S rRNA binding sites by using peptide nucleic acids for detection of legionellae in biofilms*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. **72**(8): p. 5453-5462.
74. Almeida, C., *Fluorescence In Situ Hybridization Method Using a Peptide Nucleic Acid Probe for Identification of Salmonella spp. in a Broad Spectrum of Samples*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. **76**(13): p. 4476-4485.
75. Brehm-Stecher, B.F., J.J. Hyldig-Nielsen, and E.A. Johnson, *Design and evaluation of 16S rRNA-targeted peptide nucleic acid probes for whole-cell detection of members of the genus Listeria*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. **71**(9): p. 5451-5457.
76. Almeida, C., *Discriminating Multi-Species Populations in Biofilms with Peptide Nucleic Acid Fluorescence In Situ Hybridization (PNA FISH)*. Plos One, 2011. **6**(3).
77. Fraser, J.A. and W.H. Sperber, *Rapid detection of listeria spp in food and environmental-samples by esculin hydrolysis*. Journal of Food Protection, 1988. **51**(10): p. 762-765.
78. Werckenthin, C., *Rapid identification of the animal pathogens Streptococcus uberis and Arcanobacterium pyogenes by fluorescence in situ hybridization (FISH)*. Veterinary Microbiology, 2012. **156**(3-4): p. 330-335.
79. Callewaert, L., *Food applications of bacterial cell wall hydrolases*. Current Opinion in Biotechnology, 2011. **22**(2): p. 164-171.

80. Zhang, X.F., *Peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for identification of Listeria genus, Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii*. International Journal of Food Microbiology, 2012. **157**(2): p. 309-313.
81. Arutyunyan, R., *Comet-FISH using peptide nucleic acid probes detects telomeric repeats in DNA damaged by bleomycin and mitomycin C proportional to general DNA damage*. Mutagenesis, 2004. **19**(5): p. 403-408.
82. MicroVal, S., *MicroVal: a European approach to the certification of new microbiological methods*. International Journal of Food Microbiology, 1998. **45**(1): p. 17-24.
83. AFNOR, *General rules of the NF Validation mark*. 2011.
84. De Smedt, J.M., *AOAC validation of qualitative and quantitative methods for microbiology in foods*. International Journal of Food Microbiology, 1998. **45**(1): p. 25-28.
85. Andrews, W.H., *AOAC Internationals three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods*. Trends in Food Science & Technology, 1996. **7**(5): p. 147-151.
86. Trullols, E., I. Ruisanchez, and F.X. Rius, *Validation of qualitative analytical methods*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2004. **23**(2): p. 137-145.
87. AOAC-RI, *Performance Tested Methods Program Policies and Procedures*, 2009.
88. Almeida, C., *Detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples*. International Journal of Food Microbiology, (0).
89. AOAC, I. 2013 12/03/2013]; Available from: <http://www.aoac.org/testkits/testedmethods.html>.
90. Tricker, R., *ISO 9001:2008 for small businesses*2010, Reino Unido: Elsevier Ltd.
91. Stevenson, T.H. and F.C. Barnes, *Fourteen years of ISO 9000: impact, criticisms, costs, and benefits*. Business Horizons, 2001. **44**(3): p. 45-51.
92. ISO, *The ISO Survey of ISO 9001:2000 and ISO 14001 Certificates*2006, Geneva: International Organization for Standardization.
93. GEC, *Guia de Empresas Certificadas*2007, Lisboa: Cempalavras.
94. Buttle, F., *ISO 9000: marketing motivations and benefits*. International Journal of Quality & Reliability Management, 1997: p. 936-947.
95. Jones, R., Arndt, G., Kustin, R., *ISO 9000 among Australian companies: impact of time and reasons for seeking certification on perceptions of benefits received*. International Journal of Quality & Reliability Management, 1997: p. 650-660.
96. Mo, J.e.C., A. , *Strategic for the successful implementation of ISO 9000 in small and medium manufacturers*. The TQM Magazine, 1997: p. 135-145.
97. Brown, A., van der Wiele, T., Loughton, K. and . *Smaller enterprises experiences with ISO 9000*. International Journal of Quality & Reliability Management, 1998: p. 273-285.
98. Bryde, D.e.S., B. , *Quality management systems certification: a survey*. International Journal of Quality & Reliability Management, 1998: p. 467-480.
99. Douglas, A., Coleman, S., Oddy, R. , *The case for ISO 9000*. The TQM Magazine, 2003: p. 316-324.
100. Llopis, J.e.T., J. , *The importance of internal aspects in quality improvement*. International Journal of Quality & Reliability Management, 2003: p. 304-324.
101. Magd, H.e.C., A., *An empirical analysis of management attitudes towards ISO 9001:2000 in Egypt*. The TQM Magazine, 2003: p. 381-390.
102. Bhuiyan, N.e.A., N. , *ISO 9001:2000 implementation-the North American experience*. International Journal of Quality & Reliability Management, 2004: p. 10-17.
103. Leung, H., Chan, K., Lee, T. , *Costs and benefits of ISO 9000 series: a practical study*. International Journal of Quality & Reliability Management, 1999: p. 675-690.

104. Escanciano, C., Fernández, E., Vasquez, C. , *ISO 9000 certification and quality management in Spain: results of a national survey*. The TQM Magazine, 2001: p. 192-200.
105. Sampaio, A.C.A., *Estudo do Fenómeno ISO 9000: Origens, Motivações, Consequências e Perspectivas*2008, Universidade do Minho: Departamento de Produção e Sistema.
106. Hooper, J.H., *The Porcess Approach to QMS In ISO 9001 and ISO 9004*. American Society for Quality, 2012.
107. ABNT, *Sistema de gestão de qualidade: requisitos*. 2000.
108. Mello, C.H.P., *ISO 9001:2001:sistema de getão de qualidade para operações de produção e serviços*2002, São Paulo: Atlas
109. Almeida, C., et al., *Development and Application of a Novel Peptide Nucleic Acid Probe for the Specific Detection of Cronobacter Genomospecies (Enterobacter sakazakii) in Powdered Infant Formula*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. **75**(9): p. 2925-2930.

Anexo 1

Data Submission Requirement documents

Description of BIOMODE S.A.

The BIOMODE SA is a startup company in Guimarães, which has the purpose to commercialize kits of molecular diagnostic based on the technology Peptide Nucleic Acid Fluorescence *in situ* Hybridization (PNA-FISH) for application in clinical and food fields. BIOMODE was founded in December of 2010. The first BIOMODE's product is the kit Probe4salmonella, which is used for *Salmonella* spp. detection in food samples. These kits reduce drastically the time of detection, comparatively with conventional methods, along with high specificity and applied to wide range of samples (milk, eggs and mayonnaise, etc). The PNA probe (synthetic DNA analogue) is capable of hybridizing to complementary nucleic acid targets, to a conserved RNA sequence. Once occurred the hybridization, a fluorescence signal is emitted, which allow to observe the presence or absence of *Salmonella* spp. with an epifluorescence microscope or eventually flow cytometry. The BIOMODE has no products in the market and wants to begin commercialize the kit Probe4salmonella after the process of certification.

PNA FISH description

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) is a well-established technique that is used for a variety of purposes, ranging from pathogen detection in clinical diagnostics to the determination of chromosomal stability in stem cell research. This method is usually based on the specific binding of nucleic acid probes (with a fluorochrome coupled) to particular rRNAs, due to their higher numbers of copies in the cells.

Prior to the analysis of the hybridization results by epifluorescence microscopy or eventually flow cytometry, the FISH method usually comprises three steps – fixation, hybridization and washing. The fixation step involves the application of chemical fixatives, such as formalin, paraformaldehyde and ethanol that are very commonly used in bacterial and human cells. During the hybridization step, temperature, pH, ionic strength and formamide concentrations are all well defined to guarantee that the probe accesses and hybridizes with the target sequence. The washing step ensures that all

loosely bound or unbound labelled probes are removed from the sample, hence providing specificity to the detection. After optimization of the hybridization method, it is expected that the probes will only recognize their complementary sequence, hence providing specificity to the method.

The peptide nucleic acid probe (PNA) is synthetic molecule. Because of his chemical configuration, the nucleobases are practically positioned in the same place and within the same distance as it occurs to the natural DNA. Consequently, PNA can hybridize with complementary DNA or RNA sequences. In addition, hybridization could be performed efficiently under low salt concentrations among other advantages compared with DNA probes.

Methods

Conventional culture-based methods, Real time PCR, immunocapture assay (ICA), a peptide nucleic acid fluorescence *in situ* hybridization (PNA FISH) were tested in three different types of food samples (eggs, milk and mayonnaise), all obtained from Pingo Doce, Braga. Initially, 25 g or ml of each type of food were mixed with 225 ml of pre-warmed buffered peptone water, BPW (for culture, PCR and PNA FISH techniques), or primary medium supplemented with 5 ml of phage solution (for the immunocapture method, RapidChek). The samples were then artificially contaminated with *Salmonella* concentrations ranging from 0.01 CFU/25g or ml to 100 CFU/25g or ml of food. A non-inoculated food sample was included with each experiment to ensure that samples were *Salmonella*- free. Three different enrichment protocols were followed according to each detection method (see below). Three independent experiments were performed for each method.

For the detection of *Salmonella* using conventional culture-based methods, the ISO 6579:2002 was followed. Briefly, artificially contaminated samples prepared as described above, were incubated overnight at 37°C at 120 rpm. After pre-enrichment, 100 µl and 1 ml samples were taken and mixed with 10 ml of Rappaport Vassialidis soya (RVS) broth (Liofilchem) and Muller Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth (Liofilchem), respectively. Cultures were also incubated overnight at 37°C for MKTTn broth and at 42°C for RSV broth. After the selective enrichment step, a loopful of each enriched sample was streaked on differential medium, such as

MacConkey, xylose lysine desoxycholate (XLD), or brilliant green phenol red agar (BGA). Finally, 5 presumptive *Salmonella* colonies from each selective agar medium were also confirmed biochemically.

Real time PCR was performed according to the manufacturer instructions (http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/357-8123_iQ-Check_Salmonella_II_user_guide.pdf). Artificially contaminated samples were incubated for $21\text{h} \pm 1\text{ h}$ at $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ without shaking. Following the incubation period, $100\text{ }\mu\text{L}$ samples were taken from the top without disturbing the food debris. For mayonnaise, samples were taken under the lipid layer formed on the top of the culture media. The $100\text{ }\mu\text{L}$ samples of the enriched suspension were mixed with $100\text{ }\mu\text{L}$ of the lysis buffer. Then, lysis was performed by incubating the suspension at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 min in a dry-block heater (CH-100, BIOSAN). Subsequently, lysed samples were vortexed and centrifuged at $12,000\text{g}$ for 5 min. The PCR mix, containing the usual expected constituents as well as a molecular beacon probe and an internal control, was prepared according to the kit instructions and $45\text{ }\mu\text{L}$ were mixed with $5\text{ }\mu\text{L}$ of the supernatant obtained in the previous step. Beyond the normal compounds of a PCR reaction, the mix contains a Molecular Beacon probe labeled with Carboxyfluorescein (FAM) at the 5' end and DABCYL at the 3' end that acted as a quencher. The probe from iQ-Check *Salmonella* kit targets the *iagA* (invasion associated gene) which is highly specific to *Salmonella* species [1]. To monitor for successful DNA amplification in each reaction tube, the kit provides synthetic DNA as part of the reaction mixture, which works as an 'internal control'. This control is detected with a specific probe at the same time as the *Salmonella* DNA sequence. For positive and negative controls, $5\text{ }\mu\text{L}$ of sample or reagent D (negative control) or reagent E (positive control) were also mixed with $45\text{ }\mu\text{L}$ of the amplification mix. At least one positive and one negative control were included in each PCR run. Next, the PCR plate was placed in a thermocycler (model CFX96,C1000, Bio-Rad Laboratories) and run under the following cycling conditions: $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 2 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min, ($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 20 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s) $\times 50$ cycles, and $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 5 min. Results were interpreted according to the instructions in the real-time PCR system user guide for iQ-Check kits. Briefly, in each PCR assay a Ct value > 10 for the *iagA* probe was considered positive and Ct values of 0 (non-amplified, NA) were considered negative if the internal control presented a Ct value ≥ 28 . If the Ct value for

both probes was zero, the PCR assay was repeated with a tenfold diluted DNA template suspension to avoid PCR inhibitors.

For the ICA using the RapidChek SELECT Salmonella kit (SDIX), artificially contaminated samples were prepared in primary medium as described above. Then samples were incubated for 16 to 21 hours at 42°C. Subsequently, 100 µl samples were transferred to the 1 ml of pre-warmed secondary medium and incubated for another 16 to 21 hours at 42°C. After the secondary enrichment, a strip was placed on each tube and results were read after 10 minutes according to the manufacturer instructions. Each experiment was repeated three times and a non-inoculated sample was simultaneous used to check for any indigenous contamination in the food samples selected.

The hybridization on glass slides was performed as described in Guimarães *et al.* with some modifications [2]. Smears of each strain were prepared by standard procedures and immersed in 4% (wt/vol) paraformaldehyde (Sigma) followed by 50% (vol/vol) ethanol for 10 min each and allowed to air dry. The smears were then covered with 20 µl of hybridization solution containing 10% (wt/vol) dextran sulfate (Sigma), 10 mM NaCl (Sigma), 30% (vol/vol) formamide (Sigma), 0.1% (wt/vol) sodium pyrophosphate (Sigma), 0.2% (wt/vol) polyvinylpyrrolidone (Sigma), 0.2% (wt/vol) Ficoll (Sigma), 5 mM disodium EDTA (Sigma), 0.1% (vol/vol) Triton X-100 (Sigma), 50 mM Tris-HCl (pH 7.5; Sigma), and 200 nM PNA probe. Samples were covered with coverslips, placed in moist chambers, and incubated for 30 min at 57°C. Subsequently, the coverslips were removed, and the slides were submerged in a prewarmed (57°C) washing solution containing 5 mM Tris base (Sigma), 15 mM NaCl (Sigma), and 1% (vol/vol) Triton X (pH 10; Sigma). Washing was performed at 57°C for 30 min, and the slides were allowed to air dry. The smears were mounted with one drop of nonfluorescent immersion oil (Merck) and covered with coverslips. The slides were stored in the dark for a maximum of 24 h before microscopy.

The hybridization method in suspension was based on the procedure of Perry-O' Keefe *et al.* with slight modifications [3]. For all strains, cells from 1-day-old cultures were harvested from TSA plates, suspended in sterile water, and homogenized by vortexing for 1 min. Subsequently, 1 ml of cell suspension was pelleted by centrifugation at

10,000 × g for 5 min, resuspended in 500 µl of 4% (wt/vol) paraformaldehyde (Sigma), and fixed for 1 h. The fixed cells were rinsed in autoclaved water, resuspended in 500 µl of 50% (vol/vol) ethanol, and incubated for 30 min at -20°C. Subsequently, 100 µl of the fixed-cell aliquot was pelleted by centrifugation and rinsed with sterile water, resuspended in 100 µl of hybridization solution with 200 nM PNA probe (as described above), and incubated at 57°C for 30 min. After hybridization, cells were centrifuged at 10,000 × g for 5 min, resuspended in 500 µl of wash solution (as described above), and incubated at 57°C for 30 min. Washed suspension was pelleted by centrifugation and resuspended in 500 µl of sterile water. Finally, 20 µl of the cell suspension was spread on a microscope slide, or 200 µl was filtered through a membrane (pore size, 0.2 µm; cellulose nitrate; Whatman). Samples were allowed to air dry; they were mounted with one drop of nonfluorescent immersion oil (Merck), and covered with coverslips. The slides were stored in the dark for a maximum of 24 h before microscopy.

For the detection of *Salmonella* in artificially contaminated blood, 10 ml of horse blood (ProBiológica, Portugal) was mixed with 90 ml of tryptic soy broth (TSB) (VWR, Portugal) culture medium. TSB was inoculated at three different *Salmonella* contamination levels (1, 10, and 100 CFU/total volume) and incubated overnight at 37°C with agitation at 120 rpm. A noninoculated culture was prepared in parallel and exposed to the same conditions as a control. Samples of 1 ml were recovered from each culture to perform hybridization in suspension or on glass slides, as described above. The samples were diluted 1 to 10 before the hybridization procedure. *Salmonella* detection was also performed using selective and/or differential medium, such as MacConkey, xylose lysine desoxycholate (XLD), or brilliant green phenol red agar (BGA), and also confirmative bio-chemical tests (triple sugar iron, urea agar, and Api 20E). This experiment was performed three times for two different strains, *S. enterica* serovar Enteritidis ATCC 13076 and *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 (ATCC 43971). The enriched culture concentration was determined by CFU count on TSA plates and by PNA-FISH. Quantification of the cell number by PNA-FISH was obtained by epifluorescence microscopy, as described below. A total of 15 fields with an area of 0.0158 mm² were counted using image analysis software, and the average was used to calculate total cells per ml of sample.

The detection of *Salmonella* in powdered infant formula (PIF) was based on Almeida *et al.* [109]. The infant formula (NAN 1 Premium; Nestle) was reconstituted by mixing 10 g in 80 ml of sterile distilled water. Serial 10-fold dilutions of a *S. enterica* ATCC 13076 culture were made in sterile distilled water, and 10-ml volumes were added to 90 ml of the reconstituted formula to obtain final concentrations of *Salmonella* ranging from 1×10^{-4} to 1×10^7 CFU/ml (corresponding to 1×10^{-2} to 1×10^9 CFU/10 g). After an 8-h enrichment step at 37°C, 1-ml samples were taken and diluted 1 to 10, and hybridization was performed in suspension or on glass slides, as earlier described. An uninoculated culture was prepared in parallel and exposed to the same conditions as the control. *Salmonella* detection was also performed using selective and/or differential medium and confirmative biochemical tests. This experiment was performed three times and repeated with the *S. enterica* LT2 strains. The enriched culture concentration was determined by counting the CFU on TSA plates and by PNA-FISH.

For the detection of *Salmonella* in feces, porcine feces (Ribeirense Lda., Braga, Portugal) were aseptically collected directly from the gut into a sterile flask, and 10 g was mixed with 100 ml of buffered peptone water (BPW) (VWR, Portugal) and incubated overnight at 37°C with agitation at 120 rpm. A 1-ml sample was collected to perform hybridization in suspension or on glass slides as described above. Other samples were also taken and mixed 1 to 100 with Rappaport Vassiliadis soya (RVS) broth (Liofilchem, Italy) and 1 to 10 with Muller Kauffmann tetrathionate-novobiocin (MKTTn) broth (Liofilchem, Italy). Cultures were incubated overnight at 37°C for MKTTn broth and at 42°C for RSV broth. After the selective enrichment step, 1-ml samples were also collected to perform hybridization, and the protocol followed for *Salmonella* detection was according to ISO 6579:2002. For hybridization on slides, samples were diluted (1 to 10) before smear preparation. This experiment was also performed three times. Before samples were mounted with immersion oil, they were covered with 20 µl (10 µg/ml) of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma) and incubated for 10 min in the dark. Excess DAPI was gently removed, and the sample was allowed to air dry; it was then mounted with nonfluorescent immersion oil (Merck), and

covered with coverslips. The percentage of *Salmonella* in the enriched cultures was determined by PNA-FISH counts as described above.

For *Salmonella* detection in water, we aseptically collected natural water from a fountain in a highly eutrophic state, which makes it green, at Bom Jesus, Braga. Then, three different volumes were mixed with 50 ml of BPW as recommended by ISO 6340:1995. The water volumes used were 5, 25, and 100 ml. For the 5-ml sample, the 50 ml of BPW was prepared with only 45 ml of distilled water. The 25-ml sample was mixed with 25 ml of BPW 2-fold concentrated. The 100-ml water sample was aseptically filtered, and then the filter was placed in 50 ml of BPW. The three water dilutions were incubated overnight at 37°C with agitation at 120 rpm. After this preenrichment step, 1-ml samples were taken to perform hybridization in suspension or on glass slides as described above. Subsequently, 1 ml of BPW cultures was mixed with 100 ml of RSV broth. Cultures were incubated overnight at 42°C with agitation at 120 rpm. After this selective enrichment step, 1-ml samples were also collected to perform hybridization. *Salmonella* detection continued with the confirmative tests, according to the ISO procedure. This experiment was also performed three times. Before samples were mounted with immersion oil, they were covered with 20 µl of DAPI and incubated for 10 min in the dark. The excess DAPI was removed, and the sample was allowed to air dry; it was then mounted with nonfluorescent immersion oil and covered with coverslips. The percentage of *Salmonella* bacteria in the enriched cultures was also determined by PNA-FISH counts.

Probe4*Salmonella*'s parameters analysis

Matrix:

The matrix used in the detection of *Salmonella* spp. were milk, eggs and mayonnaise samples [5], blood, feces, water and powdered infant formula (pif) [6].

Accuracy:

When the specificity and sensitivity of the PNA probe were tested was achieved an accuracy of 98,1% (106 number of correct results/ the number of all returned results). For testing in milk, eggs and mayonnaise samples the accuracy was 100%.

Precision:

The specificity and sensitivity of the PNA probe were tested. For this, the procedure was applied to 61 representative *Salmonella* strains from the two species and from the six *S. enterica* subspecies and to 46 other strains. The latter strains included 25 taxonomically related strains belonging to the same family (*Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, and *Serratia*) and 21 strains belonging to a different order (*Pseudomonas*), class (*Helicobacter* and *Campylobacter*), or even phylum (*Listeria* and *Staphylococcus*). Only 2 *Salmonellas* strains weren't detected by the probe (2 false negative result), whereas no hybridization was observed for the otherspecies used (0 false positive results) [6].

Comparison to Existing Methods:

Comparing the PNA-FISH with existing methods, this is faster than ICA (24h and 48 respectively), however they have the same detection limit, accuracy, specificity and sensitivity [5]. PNA-FISH delay the same time and have the same detection limit and sensitivity as Real time PCR but have higher specificity (100%, 55,6% respectively) and higher accuracy (100%, 82,2% respectively) [5]. The detection in samples of blood and water were proven to be faster than culture-based techniques, ISO 6579:2002 (less than 20hours) [6]. *Salmonella* detection in PIF was performed in less than 12 hours, which represents a time-saving of several days compared with the ISO 6579:2002 method, recommended for *Salmonella* detection in food and animal feeding stuffs [6]. In feces analysis, this method is capable of detecting *Salmonella* in less than 20 hours [6], resulting in the saving of at least 3 days compared to the ISO assay and matching the best times reported for PCR-based techniques[7-10].

Cross Reactivity:

No cross-reaction was observed on the specificity and sensitivity of the PNA probe tests (25 taxonomically related strains belonging to the same family (*Shigella*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Pantoea*, *Yersinia*, *Enterobacter*, *Escherichia*, and *Serratia* were study)) [6].

Detection Limit

PNA-FISH was able to detect bacterial concentrations as low as 1 CFU per 25g or ml of sample (Milk, eggs and mayonnaise samples) [5]. *Salmonella* spp. detection, in artificially contaminated samples, was able to detect the bacteria in samples with 1 CFU per 10 ml of blood and 1 CFU per 10 g of Pif [6].

False Positive / False Negative Rates:

2: 0/2 (False Positive / False Negative)

Bibliography

1. Miras, I., et al., NUCLEOTIDE-SEQUENCE OF IAGA AND IAGB GENES INVOLVED IN INVASION OF HELA-CELLS BY SALMONELLA-ENTERICA SUBSP ENTERICA SER TYPHI. Research in Microbiology, 1995. 146(1): p. 17-20.
2. Guimaraes, N., et al., Development and application of a novel peptide nucleic acid probe for the specific detection of Helicobacter pylori in gastric biopsy specimens. Journal of Clinical Microbiology, 2007. 45(9): p. 3089-3094.
3. Perry-O'Keefe, H., et al., Identification of indicator microorganisms using a standardized PNA FISH method. Journal of Microbiological Methods, 2001. 47(3): p. 281-292.
4. Almeida, C., et al., Development and Application of a Novel Peptide Nucleic Acid Probe for the Specific Detection of Cronobacter Genomospecies (Enterobacter sakazakii) in Powdered Infant Formula. Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(9): p. 2925-2930.
5. Almeida, C., et al., Detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples. International Journal of Food Microbiology, (0).
6. Almeida, C., et al., Fluorescence In Situ Hybridization Method Using a Peptide Nucleic Acid Probe for Identification of Salmonella spp. in a Broad Spectrum of Samples. Applied and Environmental Microbiology, 2010. 76(13): p. 4476-4485.
7. Chiu, T.H., et al., Development of PCR primers for the detection of Salmonella enterica serovar Choleraesuis based on the fliC gene. Journal of Food Protection, 2005. 68(8): p. 1575-1580.

8. Fakhr, M.K., et al., Adding a selective enrichment step to the iQ-Check (TM) real-time PCR improves the detection of Salmonella in naturally contaminated retail turkey meat products. *Letters in Applied Microbiology*, 2006. 43(1): p. 78-83.
9. Singer, R.S., et al., Use of pooled samples for the detection of Salmonella in feces by polymerase chain reaction. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2006. 18(4): p. 319-325.
10. Uyttendaele, M., K. Vanwildemeersch, and J. Debevere, Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of Salmonella. *Letters in Applied Microbiology*, 2003. 37(5): p. 386-391.

Anexo 2

Survey

Please take a moment to answer the following survey.

Your help will be greatly appreciated in the development of my research project. My thesis work is focused in molecular based techniques used for the detection of food pathogens, namely for *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Escherichia coli* spp.. This survey will allow the better understanding of routine testing procedures in food laboratories and which features are more appreciated in a testing assay.

All the answers will be kept confidential.

Thank you for your participation!

1. Please let us know how important to your food testing program are the following attributes / features

	Not important	Slightly important	Important	Quite important	Very Important
Sensitivity	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Specificity	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Resistance to inhibition of detection	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Ease of use	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Speed	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Coverage	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
High throughput	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Integration with current workflow	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
AOAC validation	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
AFNOR validation	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Cost per assay	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

2. What type of method(s) do you frequently use to perform microbiology tests in food samples in your laboratory?

- ☐ PCR
- ☐ ELISA
- ☐ Culture
- ☐ Other (please specify)

3. Of the following equipment list which ones are available in your laboratory?

- ☐ PCR
- ☐ Real-Time PCR
- ☐ Micro plate reader
- ☐ Fluorescence microscope

4. On average, how many tests for detection of the following pathogens in food samples do you perform per month in your laboratory?

	<100	100 to 250	250 to 500	>500
Salmonella spp.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Listeria monocytogenes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E. coli O157:H7	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E. coli	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

5. On average, how long does it take to perform an assay for each of the following food pathogens (not including enrichment)?

	< 3 hours	3 to 8 hours	8 to 24 hours	> 24 hours
Salmonella spp.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Listeria monocytogenes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E. coli O157:H7	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E. coli	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

6. If you use rapid test kits (excluding culture medium) for performing assays to detect the following food pathogens what is the cost range of the kit per assay?

	< \$5	\$5 to \$10	\$10 to \$20	> \$20
Salmonella spp.	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Listeria monocytogenes	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E. coli O157:H7	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
E. coli	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

7. Would you be willing to switch to a new rapid test method that provides accurate result for food pathogen detection within 24 hours if the price per assay is competitive?

☐ Yes

☐ Yes, if an international body like AOAC or AFNOR validates it

☒ Maybe

☐ No

(If no or maybe, please let us know why)

8. Additional comments (if possible, please identify the company and its location):

Comentários adicionais

16-1-2013

Nidal Kahl Portland

Anything <48hr for Salmonella & Listeria is good. Must be AOAC-RI at a minimum; AOAC Official Method would be ideal and preferred. Most labs pay <\$6-\$8/test with media per sample so you need have a good reason for anyone to switch methods. Time and cost are key. Any accredited lab would have to validate this in house first and then get it on scope of accreditation. A lot of work to switch and disruptive to a production lab so cost of the test is likely the largest hurdle assuming the specificity and sensitivity are in line with current methods. Must know limits of tests in terms of cross-reactivity with no inhibition in a variety of matrices. The less hands on time, the less transfers, and the faster the results, the greater the likelihood of getting people to switch over. Call if you have any questions.

28-11-2012

Laboratori Agència Salut Pública de Catalunya a Girona c/ del Sol, 15 17004 Girona (Catalunya) Spain

30-10-2012

Public Health Laboratory (Regional Government) Valencia (Spain)

30-10-2012

Nordlab A/S, DK-9990 Skagen, Denmark e-mail: nordlab@nordlab.dk It is the total time of analysis including enrichment, which is important. We have tried real-time PCR, but the cost was much too high, and the time to result too long compared to fast, modern culture methods, because of the necessity of an enrichment step to get the necessary sensitivity in the PCR detection. For the time being Nordlab participate in a Listeria monocytogenes project to test the practical use of real-time PCR (e.g. the BAX system) in industry and commercial labs compared with traditional culture methods - we do the culture methods. From the answers of my customers my conclusion is that the real-time PCR analyses are too slow due to the necessity of a 24 hours enrichment step, too expensive and very often it do not fit into the normal workflow and work time of factory and commercial labs. Best regards Torben P. Kristensen Lab. manager

2-10-2012

Laboratory AQMC Montpellier (France : Departement Herault) Microbiology tests on food and cosmetics

2-10-2012

Geneius labs Newcastle UK NE1 7RU

20-9-2012

ATC Microbiology, LLC North Little Rock, AR We have only recently brought the 3M MDS on line as part of our pathogen screening methods. We are quite happy with it. The data is easily exported to LIMS or for capture in EXCEL template for hard copy source document. Similarly a batch can be imported into a batch build from LIMS. The technicians enjoy it for its ease of use as opposed to the transfers associated with ELISA and the regrowth time and varying inocula for the PCR assays. It is simple to run different targets in the same instrument run as well. It is hard to imagine my switching to a different method as I am getting <24h TAT in a reliable format. I will probably never use a lateral flow assay.

18-9-2012

what type of new method & where are the agent in UAE

13-9-2012

Institute of Public Health Dr A.Stampar, Croatia

13-9-2012

Laboratoire d'Analyses Sèvres Atlantique, ZI Montplaisir, 79 210 Champdeniers. The question 5 is ambiguous : We are obliged to confirm each suspect result from first assay, with a second method, based on a different principle for L monocytogens (chromogenic) and Salmonella (ELISA), so for both, I should perhaps have answered >24h...

13-9-2012

Finland

13-9-2012

We are using Vidas, RT-PCR and Tempo pathogen identification system for analysing Salmonella, Listeria, E.coli, Saph. aureus etc. P Senthilnathan E-mail: p.senthilnathan@yahoo.co.in India

12-9-2012

Thank you for the research. My company is located in Brazil specific Santa Catarina state. Our homepage is www.ziniaanalises.com.br

6-8-2012

We tests for *Listeria* spp and not *L. monocytogenes*

26-7-2012

We dont use rapid tests, because we use essentially culture methods and wie also dont use PCR. So ignore number 3. and 6. There seemed to be a misstake in qou survey, because I could not submit anything to you without choosing one of this answers.

26-7-2012

The ISO inspection cartel (via UKAS) is exploiting its monopoly position and EC 2073 by pushing Official Control Labs to use ISO methods - it does not truly acknowledge AOAC and AFNOR validation. We have found an accredited and AFNOR-validated one-day method to be inferior to 5-day enrichment methods for environmental listeria.

25-7-2012

The ability to detect *Lm* with a significantly shorter than 24 hour enrichment time and short time to results comparable to PCR or ELISA with validated reliable sensitivity at least as good as AOAC or FDA culture methods would be highly sought after even at a higher per test cost.

Tabela 1 Correlação entre o volume de ensaios para cada microrganismo estudado com a disposição para a alteração para uma técnica de detecção rápida.

<100 (número de ensaios)				
	Sim (%)	Não (%)	Talvez (%)	Sim, se uma entidade internacional como AOAC ou AFNOR validar o método (%)
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>L. monocytogenes</i>	11,1	0,0	0,0	88,9
<i>E. coli</i> O157:H7	11,1	0,0	22,2	88,9
<i>E. coli</i>	0,0	0,0	25,0	75,0
100 a 250 (número de ensaios)				
	Sim (%)	Não (%)	Talvez (%)	Sim, se uma entidade internacional como AOAC ou AFNOR validar o método (%)
<i>Salmonella</i> spp.	50,0	0,0	0,0	50,0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>E. coli</i> O157:H7	50,0	0,0	0,0	50,0
<i>E. coli</i>	20,0	0,0	20,0	60,0
250 a 500 (número de ensaios)				
	Sim (%)	Não (%)	Talvez (%)	Sim, se uma entidade internacional como AOAC ou AFNOR validar o método (%)
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	0,0	66,7	33,3
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	0,0	100,0	0,0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>E. coli</i>	33,3	0,0	0,0	66,7
>500 (número de ensaios)				
	Sim (%)	Não (%)	Talvez (%)	Sim, se uma entidade internacional como AOAC ou AFNOR validar o método (%)
<i>Salmonella</i> spp.	25,0	0,0	25,0	50,0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	0,0	0,0	100,0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	0,0	50,0	50,0
<i>E. coli</i>	0,0	0,0	33,3	66,7

Tabela 2: Correlação entre o custo e tempo de detecção para um ensaio.

	<5\$ (%)	5-10\$ (%)	10-20\$ (%)	> 20\$ (%)	Não respondeu (%)
<3h					
<i>Salmonella</i> spp.	66,7	0,0	0,0	33,3	0
<i>L. monocytogenes</i>	100,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	50,0	50,0	0,0	0,0	0
<i>E. coli</i>	50,0	50,0	0,0	0,0	0
3-8h					

<i>Salmonella</i> spp.	0,0	0,0	100,0	0,0	0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	25,0	50,0	25,0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	0,0	50,0	50,0	0
<i>E. coli</i>	0,0	0,0	100,0	0,0	0
8-24h					
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	40,0	20,0	20,0	20,0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	75,0	0,0	25,0	0,0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	66,7	0,0	33,3	0,0
<i>E. coli</i>	0,0	50,0	16,7	33,3	0,0
>24					
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	0,0	20,0	20,0	60,0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	0,0	20,0	20,0	60,0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	16,7	16,7	16,7	50,0
<i>E. coli</i>	20,0	20,0	0,0	0,0	60,0

Table 3: Correlação entre o número de ensaios que se realiza num mês com o tempo de detecção.

	<3h (%)	3-8h (%)	8-24h (%)	>24h (%)	Não respondeu (%)
<100 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	0,0	33,3	66,7	0
<i>L. monocytogenes</i>	11,1	11,1	33,3	44,4	0
<i>E. coli</i> O157:H7	22,2	11,1	11,1	55,6	0
<i>E. coli</i>	25,0	0,0	0,0	75,0	0
100-250 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	0	50	50	0	0
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	0	50	50	0	0
<i>E. coli</i>	0	20	40	40	0
250- 500 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	100,0	0,0	0,0	0,0	0
<i>L. monocytogenes</i>	33,3	33,3	33,3	0,0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	0,0	0,0	100,0	0
<i>E. coli</i>	33,3	0,0	66,7	0,0	0
>500 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	25,0	50,0	25,0	0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	50,0	50,0	0,0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	50,0	0,0	50,0	0,0	0

<i>E. coli</i>	0,0	0,0	33,3	66,7	0
----------------	-----	-----	------	------	---

Table 4: Correlação entre o custo por ensaio e o número de ensaios por mês.

	<5\$ (%)	5-10\$ (%)	10-20\$ (%)	> 20\$ (%)	Não respondeu (%)
<100 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	16,7	16,7	16,7	50,0
<i>L. monocytogenes</i>	11,1	22,2	22,2	22,2	22,2
<i>E. coli</i> O157:H7	11,1	11,1	11,1	22,2	44,4
<i>E. coli</i>	25,0	25,0	0,0	0,0	50,0
100- 250 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	0	0	50	0	50
<i>L. monocytogenes</i>	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> O157:H7	0	0	50	0	50
<i>E. coli</i>	0	20	20	20	40
250- 500 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	66,7	0,0	0,0	33,3	0
<i>L. monocytogenes</i>	33,3	33,3	0,0	33,3	0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	0,0	100,0	0,0	0
<i>E. coli</i>	0,0	33,3	33,3	33,3	0
>500 (número de ensaios)					
<i>Salmonella</i> spp.	0,0	25,0	50,0	0,0	25,0
<i>L. monocytogenes</i>	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
<i>E. coli</i> O157:H7	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
<i>E. coli</i>	33,3	33,3	33,3	0,0	0,0

A BIOMODE SA adota como objeto social a prestação de serviços e comércio de produtos de diagnóstico na área da biotecnologia, assim como a investigação e desenvolvimento em biotecnologia e o comércio, importação e exportação de produtos para diagnóstico clínico. Atividades de ensaios e análises técnicas, designadamente na área clínica e do sector alimentar. Sendo um empresa que de dedica especificamente a comercialização de métodos de diagnóstico moleculares baseados na tecnologia PNA FISH (Peptide Nucleic Acid Fluorescence *in situ* Hybridization) com aplicações clínicas e na indústria agro-alimentar.

Na área alimentar tem como propósito a comercialização do kit Probe4Salmonella para a deteção rápida de *Salmonella* spp. em amostras alimentares depois de obter a respetiva certificação. A certificação na área alimentar não é obrigatória, contudo a BIOMODE definiu como objetivo a obtenção da mesma. Esta terá a finalidade de garantir que o kit seja tão bom ou melhor que os métodos tradicionais. Posteriormente, pretende-se ampliar a outros tipos de microrganismos patogénicos, introduzindo no mercado kits para deteção de *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli*, também com a respetiva certificação. Inicialmente ir-se-á obter certificação ao nível dos Estados Unidos da América e futuramente obter-se-á uma certificação para a União Europeia. Neste sector a BIOMODE irá subcontratar tanto a produção como a distribuição dos kits.

Na área clinica a BIOMODE tenciona comercializar o kit Probe4Pylori para a deteção rápida de *Helicobacter pylori* e sua resistência à claritromicina. A BIOMODE pretende afirmar-se no mercado internacional e como tal, toma as certificações como um procedimento essencial para o cumprimento deste objetivo. Para além disto a BIOMODE está sujeita à obrigatoriedade de certificação dos seus produtos para a área clínica. Assim como na área alimentar a BIOMODE decidiu iniciar a certificação para os Estados Unidos da América seguindo-se certificação para a União Europeia. A BIOMODE projeta licenciamento da produção deste kit.

Anexo 4

Batch n° _____
 Date: _____

 PNA S14_594 – 100 μ M

 Batch n° SSAL1410001

Compounds	Batch	Amount required
PNA S14_594	121205PO-04	127.27 μ g
Solution 1% TFA e 10% ACN	TFAACN0001	263 μ L

 Amount produced 263 μ l

 PNA BPSAL15 – 100 μ M

 Batch n° SSALBP10001

Compounds	Batch	Amount required
PNA BPSAL 15	121205PO-03.	209.7 μ g
Solution 1% TFA e 10% ACN	TFAACN0001	514 μ L

 Amount produced 514 μ l

 PNA S14_594 – 4 μ M

 Batch n° SSAL1420001

Compounds	Batch	Amount required
PNA S14_594 – 100 μ M	SSAL1410001	200 μ L
H ₂ O ultra pura	-----	4.8 mL

 Amount produced 5.0 ml

 PNA BPSAL15 – 4 μ M

 Batch n° SSALBP20001

Compounds	Batch	Amount required
PNA BPSAL15 – 100 μ M	SSALBP10001	200 μ L
H ₂ O ultra pura	-----	4.8 mL

 Amount produced 5.0 ml

PNA – 200nM

 Batch nº SSALH0001

Compounds	Batch	Amount required
PNA S14_594 – 4 μ M	SSAL1420001	3.75 mL
PNA BPSAL15– 4 μ M	SSALBP20001	3.75 mL
Solução de Hibridação	HIB0001	75 mL

 Amount produced 82.5 ml

Washing buffer

 Batch nº WASH0001

Compounds	Batch	Amount required
5 mM Tris Base	090M54441V	72.719 g
15 mM NaCl	SZBC2140V	105.125 g
1 % (V/V) Triton-X	SLBD2441V	120 mL
H ₂ O destilada	-----	1880 mL

 Amount produced 2000 ml

Fixation Solution 1

 Batch nº FIX10001

Compounds	Batch	Amount required
Paraformaldáido	SLBC3029V	6.052 g
3xPBS	PBS0001	50 mL
H ₂ O destilada	-----	100 mL
Acrodisco	10100047707	-----

 Amount produced 150 ml

Fixation Solution 2

Batch nº _____

Compounds	Batch	Amount required
Etanol 50%		

Amount produced _____ ml

Solution 3xPBS

Batch n° PBS0001

Compounds	Batch	Amount required
180 mM NaCl	SZBC2140V	4.809 g
3 mM KCl	BCBJ4258V	0.122 g
9 mM Na ₂ HPO ₄ 2H ₂ O	BCBJ0878V	0.484 g
1,5 mM KH ₂ PO ₄	SLBD0340V	0.122 g
H ₂ O ultra pura	-----	200 mL

 Amount produced 200 mL

Hybridization Solution

Batch n° HIB0001

Compounds	Batch	Amount required
10% (W/V) Sulfato de dextrano	SLBB4215V	7.522 g
10 mM NaCl	SZBC2140V	0.044 g
30% (V/V) Formamida	SLBD5095V	22.5 mL
0,1% (W/V) Pirofosfato de sódio	120M0169V	0.077 g
0,2% (W/V) Polivinilpirrolidona	BCBH3095V	0.152 g
0,2% (W/V) FICOLL	129K70014V	0.152 g
5 mM EDTA sal dissódico	LBB5956V	0.152 g
0,1% (V/V) Triton X-100	SLBD2441V	75 µL
50 mM Tris-HCl	091M5447V	0.154 g
H ₂ O destilada	----	52.5 mL
Acrodisco	10100047707	----

 Amount produced 75 mL

Anexo 5

according to Regulation (EC) No. 1907/2006

1 Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

Product identifier

Chemical type : Mixture
Product Name : Paraformaldehyde solution fixative
Dangerous : Paraformaldehyde
substances

Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Use of the substance/mixture

The product is intended for research, analysis and scientific education.

Uses advised against

None/none

Details of the supplier of the safety data sheet

Company : BioMode – Biomolecular Determination, S.A.
Address : Spinpark - Centro de Incubação de Base Tecnológica,
Avepark - Zona Industrial da Gandra, Apartado 4152,
4806-909 Guimarães, Portugal
Telephone No. : +351 253 540 194
E-mail : info@biomode-sa.com
Contact person : Laura Cerqueira

Emergency telephone

808 250 143 (PT, 24h)

2 Hazards identification

Classification of the substance or mixture

Paraformaldehyde

Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Flammable solids (Category 2)

Acute toxicity, Inhalation (Category 4)

Acute toxicity, Oral (Category 4)

Skin irritation (Category 2)

Serious eye damage (Category 1)

Skin sensitization (Category 1)

Carcinogenicity (Category 2)

Specific target organ toxicity - single exposure (Category 3)

Classification according to EU Directives 67/548/EEC or 1999/45/EC

Highly flammable. Harmful by inhalation and if swallowed. Irritating to respiratory system and skin. Limited evidence of a carcinogenic effect. Risk of serious damage to eyes. May cause sensitization by skin contact.

Label elements

Labelling according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Hazard pictograms
(CLP)



Signal word

: Danger

Hazard statements
(CLP)

: H228 - Flammable solid.
H302 - Harmful if swallowed.
H315 - Causes skin irritation.
H317 - May cause an allergic skin reaction.
H318 - Causes serious eye damage.
H332 - Harmful if inhaled.
H335 - May cause respiratory irritation.
H351 - Suspected of causing cancer.



Precautionary
statements (CLP)

: P210 - Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking.
P261 - Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/ spray.
P280 - Wear protective gloves/ eye protection/ face protection.
P305 + P351 + P338 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing

Supplemental Hazard
Statements

: None

Labelling according to Directive 67/548/EEC or 1999/45/EC

Hazard symbols :  


R-phrases : R11 - Highly flammable.
R20/22 - Harmful by inhalation and if swallowed.
R37/38 - Irritating to respiratory system and skin.
R40 - Limited evidence of a carcinogenic effect.
R41 - Risk of serious damage to eyes.

S-phrases : S26 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36/37/39 - Wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection.
S45 - In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible).

3 Composition/information on ingredients

Mixtures

Name	Product identifier	% (v/v)	Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008
Paraformaldehyde	(CAS N°) 30525-89-4	83,5	Flammable solids (Category 2) Acute toxicity, Inhalation (Category 4) Acute toxicity, Oral (Category 4) Skin irritation (Category 2) Serious eye damage (Category 1) Skin sensitization (Category 1) Carcinogenicity (Category 2) Specific target organ toxicity - single exposure (Category 3)
Potassium chloride	(CAS N°) 9011-18-1	<1	<i>Not a hazardous substance or mixture</i>
Sodium chloride	(CAS N°) 7647-14-5	16,5	<i>Not a hazardous substance or mixture</i>

 BIOMOLECULAR DETERMINATION	Safety Data Sheet Paraformaldehyde solution fixative		
Name	Product identifier	% (v/v)	Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008
Sodium phosphate dibasic dihydrate	(CAS N°) 10028-24-7	<1	Skin irritation (Category 2) Eye irritation (Category 2) Specific target organ toxicity - single exposure (Category 3)
Potassium phosphate monobasic	(CAS N°) 7778-77-0	<1	Not a hazardous substance or mixture

4 First aid measures

Description of first aid measures

General information

Consult a physician. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.

After inhalation

If breathed in, move person into fresh air. If not breathing, give artificial respiration. Consult a physician.

After contact with skin

Wash off with soap and plenty of water. Consult a physician.

After contact with eyes

Rinse thoroughly with plenty of water for at least 15 minutes and consult a physician.

After ingestion

Do NOT induce vomiting. Never give anything by mouth to an unconscious person. Rinse mouth with water. Consult a physician.

Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

no data available

5 Firefighting measures

Extinguishing media

Suitable extinguishing media

Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

Special hazards arising from the substance or mixture

Carbon oxides

Advice for firefighters

Wear self contained breathing apparatus for fire fighting if necessary.

Additional information

Use water spray to cool unopened containers.

6 Accidental release measures

Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Use personal protective equipment. Avoid dust formation. Avoid breathing vapors, mist or gas. Ensure adequate ventilation. Remove all sources of ignition. Evacuate personnel to safe areas. Avoid breathing dust.

Environmental precautions

Prevent further leakage or spillage if safe to do so. Do not let product enter drains. Discharge into the environment must be avoided.

Methods and material for containment and cleaning up

Sweep up and shovel. Contain spillage, and then collect with an electrically protected vacuum cleaner or by wet-brushing and place in container for disposal according to local regulations (see section 13). Keep in suitable, closed containers for disposal. Contain spillage, pick up with an electrically protected vacuum cleaner or by wet-brushing and transfer to a container for disposal according to local regulations (see section 13).

Reference to other sections

For disposal see section 13.

7 Handling and storage

Precautions for safe handling

Advice on safe handling

. Avoid contact with skin and eyes. Avoid formation of dust and aerosols

Advice on protection against fire and explosion

Provide appropriate exhaust ventilation at places where dust is formed. Keep away from sources of ignition. No smoking. Take measures to prevent the build up of electrostatic charge.

Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Advice on storage compatibility

Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place..

Further information on storage conditions

Store in a refrigerated zone. Recommended storage temperature: 2 - 8 °C.

8 Exposure controls/personal protection

Control parameters

Additional advice on limit values

No available data.

Exposure controls

Occupational exposure controls

Refer to chapter 7. No further action is necessary.

Respiratory protection

Where risk assessment shows air-purifying respirators are appropriate use a full-face particle respirator type N100 (US) or type P3 (EN 143) respirator cartridges as a backup to engineering controls. If the respirator is the sole means of protection, use a full-face supplied air respirator. Use respirators and components tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or CEN (EU).

Eye protection

Face shield and safety glasses Use equipment for eye protection tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or EN 166(EU).

Skin protection

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use. Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices. Wash and dry hands

The selected protective gloves have to satisfy the specifications of EU Directive 89/686/EEC and the standard EN 374 derived from it.

Immersion protection

Material: Nitrile rubber

Minimum layer thickness: 0.11 mm

Break through time: > 480 min

Material tested: Dermatrill® (Aldrich Z677272, Size M)

Splash protection

Material: Nitrile rubber

Minimum layer thickness: 0.11 mm

Break through time: > 30 min

Material tested: Dermatrill® (Aldrich Z677272, Size M)

data source: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, phone +49 (0)6659 873000, e-mail sales@kcl.de, test method: EN374

If used in solution, or mixed with other substances, and under conditions which differ from EN 374, contact the supplier of the CE approved gloves. This recommendation is advisory only and must be evaluated by an Industrial Hygienist familiar with the specific situation of anticipated use by our customers. It should not be construed as offering an approval for any specific use scenario.

Environmental exposure controls

This material and its container must be disposed of in a safe way.

9 Physical and chemical properties

Information on basic physical and chemical properties

Appearance	: Liquid
Color	: Colorless
Odor	: Not determined
pH	: 7,2
Melting point/freezing point	: Not determined
Initial boiling point and boiling range	: Not determined
Flash point	: Not determined
Evaporation rate	: Not determined
Flammability	: Not determined
Upper/lower flammability limits	: Not determined
Vapor pressure	: Not determined
Vapor density	: Not determined
Relative density	: Not determined
Solubility	: Not determined
Partition coefficient: n-octanol/water	: Not determined

10 Stability and reactivity

Chemical stability

no data available

Possibility of hazardous reactions

no data available

Conditions to avoid

Exposure to moisture.

Heat, flames and sparks. Extremes of temperature and direct sunlight.

Incompatible materials

Brass, Steel (all types and surface treatments), Copper, Acid anhydrides,
Strong oxidizing agents, Strong reducing agents

11 Toxicological information

Information on toxicological effects

Paraformaldehyde

LD50 Oral - rat	: 592 mg/kg
LC50 Inhalation - rat	: 4 h - 1,070 mg/m3
LD50 dermal - rabbit	: 10,000 mg/kg
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: Serious eye damage/eye irritation.
Skin Sensitization	: No data available.
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	: No data available.
STOT - single exposure	: No data available.
STOT - repeated exposure	: No data available.
Aspiration hazard	: No data available.

Sodium chloride

LD50 Oral - rat	: 3,550 mg/kg
LC50 Inhalation - rat	: 1 h - > 42,000 mg/m3
LD50 dermal - rabbit	: 10,000 mg/kg
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: No data available.
Skin Sensitization	: No data available..
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	: No data available.
STOT - single exposure	: No data available.
STOT - repeated exposure	: No data available.
Aspiration hazard	: No data available.

Potassium chloride

LD50 Oral - rat	: No data available.
LC50 Inhalation - rat	: No data available.
LD50 dermal - rabbit	: No data available.
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: Eyes - rabbit - Mild eye irritation - 24 h.
Skin Sensitization	: No data available.
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	: No data available.
STOT - single exposure	: No data available.
STOT - repeated exposure	: No data available.
Aspiration hazard	: No data available.

Sodium phosphate dibasic dihydrate

LD50 Oral - rat	: No data available.
LC50 Inhalation - rat	: No data available.
LD50 dermal - rabbit	: No data available.
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: No data available.
Skin Sensitization	: No data available.
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	: No data available.
STOT - single exposure	: No data available.
STOT - repeated exposure	: No data available.
Aspiration hazard	: No data available.

Potassium phosphate monobasic

LD50 Oral - rat	: No data available.
LC50 Inhalation - rat	: No data available.
LD50 dermal - rabbit	: 4,640 mg/kg
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: No data available.
Skin Sensitization	: No data available.
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	: No data available.
STOT - single exposure	: No data available.
STOT - repeated exposure	: No data available.
Aspiration hazard	: No data available.

12 Ecological information

Toxicity

Toxicity to daphnia and other aquatic invertebrates:

EC50 - Daphnia magna (Water flea) - 42 mg/l - 24 h

Persistence and degradability

No data available

Bioaccumulative potential

No data available

Mobility in soil

No data available

Results of PBT and vPvB assessment

No data available

13 Disposal considerations

Waste treatment methods

Advice on disposal

Waste disposal according to official state regulations. Consult the local waste disposal expert about waste disposal.

Waste disposal number of waste from residues/unused products

160506 WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
Classified as hazardous waste.

Waste disposal number of used product

160506 WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
Classified as hazardous waste.

Waste disposal number of contaminated packaging

150110 WASTE PACKAGING; ABSORBENTS, WIPING CLOTHS, FILTER MATERIALS AND PROTECTIVE CLOTHING NOT OTHERWISE SPECIFIED; packaging (including separately collected municipal packaging waste); packaging containing residues of or contaminated by dangerous substances
Classified as hazardous waste.

Contaminated packaging

Cleaned containers may be recycled.

14 Transport information

Land transport (ADR/RID)

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Inland waterways transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Marine transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Other applicable information (marine transport)

Air transport

Not restricted

Other applicable information (air transport)

Not restricted

15 Regulatory information

Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture

No data available

16 Other information

Changes

First edition.

Full text of R-phrases referred to under sections 2 and 3

R11 - Highly flammable.

R20/22 - Harmful by inhalation and if swallowed.

R37/38 - Irritating to respiratory system and skin.

R40 - Limited evidence of a carcinogenic effect.

R41 - Risk of serious damage to eyes.

R43 - May cause sensitization by skin contact.

Full text of H-Statements referred to under sections 2 and 3

H228 - Flammable solid.

H302 - Harmful if swallowed.

H315 - Causes skin irritation.

H317 - May cause an allergic skin reaction.

H318 - Causes serious eye damage.

H332 - Harmful if inhaled.

H335 - May cause respiratory irritation.

H351 - Suspected of causing cancer.

according to Regulation (EC) No. 1907/2006

1 Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

Product identifier

Product name: Ethanol

CAS-No.: 64-17-5

Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

- *Use of the substance/mixture*

The product is intended for research, analysis and scientific education.

- *Uses advised against*

None/none Details of the supplier of the safety data sheet

Company : BioMode – Biomolecular Determination, S.A.

Address : Spinpark - Centro de Incubação de Base Tecnológica,
Avepark - Zona Industrial da Gandra, Apartado 4152,
4806-909 Guimarães, Portugal

Telephone No. : +351 253 540 194

E-mail : info@biomode-sa.com

Contact person : Laura Cerqueira

Emergency telephone

808 250 143 (PT, 24h)

2 Hazards identification

Classification of the substance or mixture

Classification according to Regulation (EC) No 1272/2008 [EU-GHS/CLP]

Flammable liquids (Category 2)

Classification according to EU Directives 67/548/EEC or 1999/45/EC

Highly flammable.

Label elements


Labelling according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Hazard pictograms :
(CLP)



Signal word : Danger
Hazard statements (CLP) : H225 - Highly flammable liquid and vapour.
Precautionary statements (CLP) : P210 - Keep away from heat/sparks/open flames/hot surfaces. - No smoking.
Supplemental Hazard Statements : None

Labelling according to Directive 67/548/EEC

Hazard symbols : 

R-phrases : R11 - Highly flammable.

S-phrases : S7 - Keep container tightly closed.
S16 - Keep away from sources of ignition - No smoking.

3 Composition/information on ingredients

Mixtures

Name	Product identifier	% (v/v)	Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008
Ethanol	(CAS N°) 64-17-5	50	Flammable liquids (Category 2)

4 First aid measures

Description of first aid measures

- *General information*

Consult a physician. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.

- *After inhalation*

If breathed in, move person into fresh air. If not breathing, give artificial respiration.

Consult a physician.

- *After contact with skin*

Wash off with soap and plenty of water. Consult a physician

- *After contact with eyes*

Rinse thoroughly with plenty of water for at least 15 minutes and consult a physician.

- *After ingestion*

Do NOT induce vomiting. Never give anything by mouth to an unconscious person.

Rinse mouth with water. Consult a physician.

Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

no data available

5 Firefighting measures

Extinguishing media

- *Suitable extinguishing media*

Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

Special hazards arising from the substance or mixture

Carbon oxides

Advice for firefighters

Wear self contained breathing apparatus for fire fighting if necessary.

Additional information

Use water spray to cool unopened containers.

6 Accidental release measures

Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Use personal protective equipment. Avoid breathing vapors, mist or gas. Ensure adequate ventilation. Remove all sources of ignition. Evacuate personnel to safe areas. Beware of vapours accumulating to form explosive concentrations. Vapours can accumulate in low areas.

Environmental precautions

Prevent further leakage or spillage if safe to do so. Do not let product enter drains.

Methods and material for containment and cleaning up

Contain spillage, and then collect with an electrically protected vacuum cleaner or by wet-brushing and place in container for disposal according to local regulations (see section 13).

Reference to other sections

For disposal see section 13.

7 Handling and storage

Precautions for safe handling

- *Advice on safe handling*

Avoid exposure - Avoid contact with skin and eyes. Avoid inhalation of vapor or mist.

- *Advice on protection against fire and explosion*

Keep away from sources of ignition - No smoking. Take measures to prevent the build up of electrostatic charge.

Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Store in cool place. Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place. Containers which are opened must be carefully resealed and kept upright to prevent leakage.

8 Exposure controls/personal protection

Control parameters

- *Additional advice on limit values*

No available data.

Exposure controls

- *Occupational exposure controls*

Refer to chapter 7. No further action is necessary.

- *Protective and hygiene measures*

No data available

- *Respiratory protection*

Where risk assessment shows air-purifying respirators are appropriate use a full-face respirator with multi-purpose combination (US) or type ABEK (EN 14387) respirator cartridges as a backup to engineering controls. If the respirator is the sole means of protection, use a full -face supplied air respirator. Use respirators and components tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or CEN (EU).

- *Hand protection*

No data available

- *Eye protection*

Face shield and safety glasses Use equipment for eye protection tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or EN 166(EU).

- *Skin protection*

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use. Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this

product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices.

Wash and dry hands

The selected protective gloves have to satisfy the specifications of EU Directive 89/686/EEC and the standard EN 374 derived from it.

Immersion protection

Material: butyl-rubber

Minimum layer thickness: 0.3 mm

Break through time: > 480 min

Material tested: Butoject® (Aldrich Z677647, Size M)

Splash protection

Material: Nitrile rubber

Minimum layer thickness: 0.2 mm

Break through time: > 30 min

Material tested: Dermatrill® P (Aldrich Z677388, Size M)

data source: KCL GmbH, D-36124 Eichenzell, phone +49 (0)6659 873000, e-mail sales@kcl.de, test method: EN374 If used in solution, or mixed with other substances, and under conditions which differ from EN 374, contact the supplier of the CE approved gloves. This recommendation is advisory only and must be evaluated by an Industrial Hygienist familiar with the specific situation of anticipated use by our customers. It should not be construed as offering an approval for any specific use scenario.

▪ *Environmental exposure controls*

This material and its container must be disposed of in a safe way.

9 Physical and chemical properties

Information on basic physical and chemical properties

Appearance	: Liquid
Color	: Colorless
Odor	: Not determined
pH	: Not determined
Melting point/freezing point	: Not determined
Initial boiling point and boiling range	: Not determined
Flash point	: Not determined
Evaporation rate	: Not determined
Flammability	: Not determined
Upper/lower flammability limits	: Not determined
Vapor pressure	: Not determined
Vapor density	: Not determined

Relative density	:	Not determined
Solubility	:	Not determined
Partition coefficient: n-octanol/water	:	Not determined

10 Stability and reactivity

Chemical stability

no data available

Possibility of hazardous reactions

no data available

Conditions to avoid

Heat, flames and sparks. Extremes of temperature and direct sunlight.

Incompatible materials

Alkali metals, Ammonia, Oxidizing agents, Peroxides

11 Toxicological information

Information on toxicological effects

LD50 Oral - rat	: 7,060 mg/kg
LC50 Inhalation - rat	: 10 h - 20000 ppm
LD50 dermal - rabbit	: No data available.
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: Mild eye irritation - 24 h - Draize Test
Skin Sensitization	: Irritating to skin. - 24 h
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product present at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC
Reproductive toxicity	: Reproductive toxicity - Human - female - Oral Effects on Newborn: Apgar score (human only). Effects on Newborn: Other neonatal measures or effects. Effects on Newborn: Drug dependence. no data available
STOT - single exposure	: Inhalation - May cause respiratory irritation.
STOT - repeated exposure	: No data available.
Aspiration hazard	: No data available.

12 Ecological information

Toxicity

No data available

Persistence and degradability

No data available

Bioaccumulative potential

No data available

Mobility in soil

No data available

Results of PBT and vPvB assessment

No data available

13 Disposal considerations

Waste treatment methods

- *Advice on disposal*

Waste disposal according to official state regulations. Consult the local waste disposal expert about waste disposal.

- *Waste disposal number of waste from residues/unused products*

160506 WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
Classified as hazardous waste.

- *Waste disposal number of used product*

160506 WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
Classified as hazardous waste.

- *Waste disposal number of contaminated packaging*

150110 WASTE PACKAGING; ABSORBENTS, WIPING CLOTHS, FILTER MATERIALS AND PROTECTIVE CLOTHING NOT OTHERWISE SPECIFIED; packaging (including separately collected municipal packaging waste); packaging containing residues of or contaminated by dangerous substances
Classified as hazardous waste.

- *Contaminated packaging*

Cleaned containers may be recycled.

14 Transport information

Land transport (ADR/RID)

Inland waterways transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Marine transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Other applicable information (marine transport)

Air transport

Not restricted

Other applicable information (air transport)

Not restricted

16 Regulatory information

Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture

no data available

17 Other information

Changes

First edition

Full text of R-phrases referred to under sections 2 and 3

R11- Highly flammable.

Full text of H-Statements referred to under sections 2 and 3

H225 - Highly flammable liquid and vapour.

according to Regulation (EC) No. 1907/2006

1 Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

Product identifier

Chemical type : Mixture
Product Name : PNA probe and Hybridization solution
Dangerous : Formamide
substances

Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Use of the substance/mixture

The product is intended for research, analysis and scientific education.

Uses advised against

None/none

Details of the supplier of the safety data sheet

Company : BioMode – Biomolecular Determination, S.A.
Address : Spinpark - Centro de Incubação de Base Tecnológica,
Avepark - Zona Industrial da Gandra, Apartado 4152,
4806-909 Guimarães, Portugal
Telephone No. : +351 253 540 194
E-mail : info@biomode-sa.com
Contact person : Laura Cerqueira

Emergency telephone

808 250 143 (PT, 24h)

2 Hazards identification

Classification of the substance or mixture

Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Reproductive Hazard (Category 1B)


Classification according to Directive 67/548/EEC or 1999/45/EC

May cause harm to the unborn children.

Label elements


Formamide

Labelling according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Hazard pictograms (CLP)	:	
Signal word	:	Danger
Hazard statements (CLP)	:	H360D - May damage the unborn child.
Precautionary statements (CLP)	:	P201 - Obtain special instructions before use. P308 + P313 - IF exposed or concerned: Get medical advice/ attention. P210 - Keep away from heat/sparks/open flames/.../hot surfaces. ... No smoking. P403+P233: Store in a well-ventilated place. Keep container tightly closed. P281 - Use personal protective equipment as required. P263 - Avoid contact during pregnancy/while nursing.
Supplemental Hazard Statements	:	None

Restricted to professional users


Labelling according to Directive 67/548/EEC or 1999/45/EC

Hazard symbols	:	
R-phrases	:	R61 - May cause harm to the unborn child. R40 - limited evidence of a carcinogenic effect
S-phrases	:	S53 Avoid exposure - obtain special instructions before use. S45 In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show the label where possible). S36/37/39 - wear suitable protective clothing, gloves and eye/face protection S60 - this material and its container must be disposed of as hazardous waste S3/9/49 - keep only in the original container in a cool, well-ventilated place


Restricted to professional users

Triton X

Labelling according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Hazard pictograms (CLP)	:	
Signal word	:	Danger
Hazard statements (CLP)	:	H302 - Harmful if swallowed. H318 - Causes serious eye damage. H411 - Toxic to aquatic life with long lasting effects.
Precautionary statements (CLP)	:	P273 - Avoid release to the environment. P280 - Wear protective gloves/ eye protection/ face protection. P305 + P351 + P338 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove
Supplemental Hazard Statements	:	None


Labelling according to Directive 67/548/EEC or 1999/45/EC

Hazard symbols	:	
R-phrases	:	R22 - Harmful if swallowed. R41 - Risk of serious damage to eyes. R51/53 - Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
S-phrases	:	S26 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice. S39 - Wear eye/face protection. S61 - Avoid release to the environment. Refer to special instructions/ Safety data sheets.

Caution - substance not yet tested completely.


Sodium pyrophosphate

Labelling according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Hazard pictograms (CLP)	:	
Signal word	:	Warning
Hazard statements (CLP)	:	H315 - Causes skin irritation. H319 - Causes serious eye irritation. H335 - May cause respiratory irritation.
Precautionary statements (CLP)	:	P261 - Avoid breathing dust. P305 + P351 + P338 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove

Supplemental Hazard : None
Statements

Labelling according to Directive 67/548/EEC or 1999/45/EC

Hazard symbols : 

R-phrases : R36/37/38 - Irritating to eyes, respiratory system and skin.
S-phrases : S26 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36 - Wear suitable protective clothing.

Caution - substance not yet tested completely.

3 Composition/information on ingredients

Mixtures

Name	Product identifier	% (v/v)	Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008
Formamide	(CAS N°) 75-12-7 (EC N°) 200-842-0	30	Reproductive toxicity (Category 1B)
Dextran sulfate sodium	(CAS N°) 9011-18-1	10	Not a hazardous substance or mixture
Sodium chloride	(CAS N°) 7647-14-5	<1	Not a hazardous substance or mixture
Sodium pyrophosphate	(CAS N°) 13472-36-1 (EC N°) 231-767-1	<1	Skin irritation (Category 2) Eye irritation (Category 2) Specific target organ toxicity - single exposure (Category 3)
Polyvinylpyrrolone	(CAS N°) 9003-39-8	<1	Not a hazardous substance or mixture
FICOLL	(CAS N°) 26873-85-8	<1	Not a hazardous substance or mixture
Disodium EDTA	(CAS N°) 6381-92-6	<1	Not a hazardous substance or mixture
Triton X-100	(CAS N°) 9002-93-1	<1	Acute toxicity, Oral (Category 4) Serious eye damage (Category 1) Chronic aquatic toxicity (Category 2)
Tris-HCl	(CAS N°) 1185-53-1	<1	Not a hazardous substance or mixture

4 First aid measures

Description of first aid measures

General information

Consult a physician. Show this safety data sheet to the doctor in attendance.

After inhalation

Move to fresh air. Keep warm and in a quiet place. If exposed or concerned: Get medical advice/attention.

After contact with skin

Take off all contaminated clothing immediately. Wash off immediately with soap and plenty of water. Get medical advice/attention.

After contact with eyes

Rinse immediately with plenty of water for at least 15 minutes. Get medical advice/attention.

After ingestion

Rinse mouth. Few gulps of water can be drunk to reduce irritation. Do NOT induce vomiting. Get immediate medical advice/ attention.

Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

No data available.

5 Firefighting measures

Extinguishing media

Suitable extinguishing media

Foam, Dry powder, Carbon dioxide (CO₂) and water spray.

Special hazards arising from the substance or mixture

Burning may produce toxic and irritant gases. Ammonia, Hydrogen cyanide (hydrocyanic acid), Carbon monoxide, nitrogen oxides (NO_x).

Advice for firefighters

In the event of fire, wear self-contained breathing apparatus. Wear suitable protective clothing.

Additional information

No data available.

6 Accidental release measures

Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Wear respiratory protection. Avoid breathing vapors, mist or gas. Ensure adequate ventilation. Evacuate personnel to safe areas.

Environmental precautions

Should not be released into the environment. Prevent product from entering drains.

Methods and material for containment and cleaning up

Soak up with inert absorbent material and dispose of as hazardous waste. Keep in suitable, closed containers for disposal.

Reference to other sections

For disposal see section 13.

7 Handling and storage

Precautions for safe handling

Advice on safe handling

Avoid exposure - obtain special instructions before use. Avoid contact with skin and eyes. Avoid inhalation of vapor or mist.

Advice on protection against fire and explosion

No special fire protection measures are necessary.

Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Advice on storage compatibility

Keep container tightly closed in a dry and well-ventilated place. Containers which are opened must be carefully resealed and kept upright to prevent leakage.

Further information on storage conditions

Store in a refrigerated zone. Recommended storage temperature: 2 - 8 °C.

8 Exposure controls/personal protection

Control parameters

Additional advice on limit values

No available data.

Exposure controls

Occupational exposure controls

Refer to chapter 7. No further action is necessary.

Protective and hygiene measures

Facilities should be equipped with an eyewash facility and a safety shower. Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

Respiratory protection

Where risk assessment shows air-purifying respirators are appropriate use a full-face respirator with multi-purpose combination (US) or type ABEK (EN 14387) respirator cartridges as a backup to engineering controls. If the respirator is the sole means of protection, use a full-

face supplied air respirator. Use respirators and components tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or CEN (EU).

Hand protection

Handle with gloves. Gloves must be inspected prior to use. Use proper glove removal technique (without touching glove's outer surface) to avoid skin contact with this product. Dispose of contaminated gloves after use in accordance with applicable laws and good laboratory practices. Wash and dry hands. The selected protective gloves have to satisfy the specifications of EU Directive 89/686/EEC and the standard EN 374 derived from it.

Eye protection

Tightly fitting safety goggles. Face shield (8-inch minimum). Use equipment for eye protection tested and approved under appropriate government standards such as NIOSH (US) or EN 166(EU).

Skin protection

Wear appropriate protective clothing to prevent skin exposure.

Environmental exposure controls

This material and its container must be disposed of in a safe way.

9 Physical and chemical properties

Information on basic physical and chemical properties

Appearance	: Liquid
Color	: Colorless
Odor	: Odorless
pH	: 7,5
Melting point/freezing point	: Not determined
Initial boiling point and boiling range	: Not determined
Flash point	: Not determined
Evaporation rate	: Not determined
Flammability	: Not determined
Upper/lower flammability limits	: Not determined
Vapor pressure	: Not determined
Vapor density	: Not determined
Relative density	: Not determined
Solubility	: Not determined
Partition coefficient: n-octanol/water	: Not determined

10 Stability and reactivity

Chemical stability.

Stable under normal storage and handling conditions.

Possibility of hazardous reactions

No information available.

Conditions to avoid

Contact with light

Incompatible materials

Acids, bases and oxidizing agents

11 Toxicological information

Information on toxicological effects

Formamide

LD50 Oral - rat	: 5,577 mg/kg
LC50 Inhalation - rat	: 6 h - 3900 ppm
LD50 dermal - rabbit	: 17,000 mg/kg
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: Eyes - rabbit - Severe eye irritation
Skin Sensitization	: Did not cause sensitization on laboratory animals.
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product present at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC
Reproductive toxicity	: May cause congenital malformation in the fetus. Presumed human reproductive toxicant Reproductive toxicity - rat - Oral Effects on Fertility: Post-implantation mortality (e.g., dead and/or resorbed implants per total number of implants). Effects on Embryo or Fetus: Fetotoxicity (except death, e.g., stunted fetus). May cause reproductive disorders. Developmental Toxicity - rat - Skin Effects on Embryo or Fetus: Fetal death.
STOT - single exposure	: No data available.
STOT - repeated exposure	: No data available.
Aspiration hazard	: No data available.

Dextran sulfate sodium

LD50 Oral - rat	: 20,600 mg/kg
LC50 Inhalation - rat	: No data available.
LD50 dermal - rabbit	: No data available.
Skin Irritation/corrosion	: No data available.
Eye Irritation	: No data available.
Skin Sensitization	: No data available..
Genetic toxicity	: No data available.
Carcinogenicity	: No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen

Reproductive toxicity : No data available.
 STOT - single exposure : No data available.
 STOT - repeated exposure : No data available.
 Aspiration hazard : No data available.

Sodium chloride

LD50 Oral - rat : 3,550 mg/kg
 LC50 Inhalation - rat : 1 h - > 42,000 mg/m³
 LD50 dermal - rabbit : 10,000 mg/kg

Skin Irritation/corrosion : No data available.
 Eye Irritation : No data available.
 Skin Sensitization : No data available..
 Genetic toxicity : No data available.
 Carcinogenicity : No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
 Reproductive toxicity : No data available.
 STOT - single exposure : No data available.
 STOT - repeated exposure : No data available.
 Aspiration hazard : No data available.

Sodium pyrophosphate

LD50 Oral - rat : No data available.
 LC50 Inhalation - rat : No data available.
 LD50 dermal - rabbit : No data available.

Skin Irritation/corrosion : No data available.
 Eye Irritation : No data available.
 Skin Sensitization : No data available.
 Genetic toxicity : No data available.
 Carcinogenicity : No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
 Reproductive toxicity : No data available.
 STOT - single exposure : Inhalation - May cause respiratory irritation.
 STOT - repeated exposure : No data available.
 Aspiration hazard : No data available.

Polyvinylpyrrolidone

LD50 Oral - rat : 100,000 mg/kg
 LC50 Inhalation - rat : No data available.
 LD50 dermal - rabbit : No data available.

Skin Irritation/corrosion : No skin irritation
 Eye Irritation : No eye irritation
 Skin Sensitization : No data available..
 Genetic toxicity : No data available.
 Carcinogenicity : This product is or contains a component that is not classifiable as to its carcinogenicity based on its

IARC, ACGIH, NTP, or EPA classification.
3 - Group 3: Not classifiable as to its carcinogenicity to humans (1-Ethenyl-2-pyrrolidinone homopolymer) by IARC.

Reproductive toxicity : No data available.
STOT - single exposure : No data available.
STOT - repeated exposure : No data available.
Aspiration hazard : No data available.

FICOLL

LD50 Oral - rat : No data available.
LC50 Inhalation - rat : No data available.
LD50 dermal - rabbit : No data available.

Skin Irritation/corrosion : No data available.
Eye Irritation : No data available.
Skin Sensitization : No data available..
Genetic toxicity : No data available.
Carcinogenicity : No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.

Reproductive toxicity : No data available.
STOT - single exposure : No data available.
STOT - repeated exposure : No data available.
Aspiration hazard : No data available.

Disodium EDTA

LD50 Oral - rat : 2,000 mg/kg
LC50 Inhalation - rat : No data available.
LD50 dermal - rabbit : No data available.

Skin Irritation/corrosion : No skin irritation - OECD Test Guideline 404
Eye Irritation : No eye irritation - OECD Test Guideline 405
Skin Sensitization : No data available..
Genetic toxicity : No data available.
Carcinogenicity : No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.

Reproductive toxicity : No data available.
STOT - single exposure : No data available.
STOT - repeated exposure : No data available.
Aspiration hazard : No data available.

Triton X-100

LD50 Oral - rat : 1,800 mg/kg
LC50 Inhalation - rat : No data available.
LD50 dermal - rabbit : 8,000 mg/kg
Skin Irritation/corrosion : No data available.
Eye Irritation : Eyes - rabbit - Moderate eye irritation - 24 h
Skin Sensitization : No data available..
Genetic toxicity : No data available.
Carcinogenicity : No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as

		probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	:	No data available.
STOT - single exposure	:	No data available.
STOT - repeated exposure	:	No data available.
Aspiration hazard	:	No data available.

Tris-HCl

LD50 Oral - rat	:	No data available.
LC50 Inhalation - rat	:	No data available.
LD50 dermal - rabbit	:	No data available.
Skin Irritation/corrosion	:	No data available.
Eye Irritation	:	Eyes - rabbit - Mild eye irritation
Skin Sensitization	:	No data available..
Genetic toxicity	:	No data available.
Carcinogenicity	:	No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	:	No data available.
STOT - single exposure	:	No data available.
STOT - repeated exposure	:	No data available.
Aspiration hazard	:	No data available.

12 Ecological information

Toxicity

Toxicity to fish (LC50): *Leuciscus idus* - 4600 mg/L to 9 300 mg/l (96h)
 Toxicity to aquatic invertebrates (EC50): *Daphnia magna* - 500 mg/l (48 h)
 Toxicity to algae: *Desmodesmus subspicatus* - 1.141 mg/l (72 h)
 Toxicity to microorganisms: *Pseudomonas putida* – 10 000 mg/l (17 h)

Persistence and degradability

Readily biodegradable, according to appropriate OECD test.

Bioaccumulative potential

No data available

Mobility in soil

No data available

Results of PBT and vPvB assessment

No data available

13 Disposal considerations

Waste treatment methods

Advice on disposal

Waste disposal according to official state regulations. Consult the local waste disposal expert about waste disposal.

Waste disposal number of waste from residues/unused products

160506 WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
Classified as hazardous waste.

Waste disposal number of used product

160506 WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
Classified as hazardous waste.

Waste disposal number of contaminated packaging

150110 WASTE PACKAGING; ABSORBENTS, WIPING CLOTHS, FILTER MATERIALS AND PROTECTIVE CLOTHING NOT OTHERWISE SPECIFIED; packaging (including separately collected municipal packaging waste); packaging containing residues of or contaminated by dangerous substances
Classified as hazardous waste.

Contaminated packaging

Cleaned containers may be recycled.

14 Transport information

Land transport (ADR/RID)

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Inland waterways transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Marine transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Other applicable information (marine transport)

Air transport

Not restricted

Other applicable information (air transport)

Not restricted

15 Regulatory information

Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture

No data available.

16 Other information

Changes

First edition

Full text of R-phrases referred to under sections 2 and 3

R22 - Harmful if swallowed.

R36/37/38 - Irritating to eyes, respiratory system and skin.

R40 - limited evidence of a carcinogenic effect

R41 - Risk of serious damage to eyes.

R51/53 - Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

R61 - May cause harm to the unborn child.

Full text of H-Statements referred to under sections 2 and 3

H302 - Harmful if swallowed.

H315 - Causes skin irritation.

H318 - Causes serious eye damage.

H319 - Causes serious eye irritation.

H335 - May cause respiratory irritation.

H360D - May damage the unborn child

H411 - Toxic to aquatic life with long lasting effects.

according to Regulation (EC) No. 1907/2006

1 Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

Product identifier

Product Name : Washing Buffer

Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Use of the substance/mixture

The product is intended for research, analysis and scientific education.

Uses advised against

None/none

Details of the supplier of the safety data sheet

Company : BioMode – Biomolecular Determination, S.A.
Address : Spinpark - Centro de Incubação de Base Tecnológica,
Avepark - Zona Industrial da Gandra, Apartado 4152,
4806-909 Guimarães, Portugal
Telephone No. : +351 253 540 194
E-mail : info@biomode-sa.com
Contact person : Laura Cerqueira

Emergency telephone

0351 808 250 143 (24h)
CIAV, Centro de Informação antivenenos, Rua Almirante Barroso, 36
1000-013 Lisboa

2 Hazards identification

Classification of the substance or mixture

Label elements

Trizma base

Labelling according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Hazard pictograms
(CLP)



Signal word

: Warning

Hazard statements
(CLP)

: H315 - Causes skin irritation.
H319 - Causes serious eye irritation..
H335 - May cause respiratory irritation..

Precautionary
statements (CLP)

: P261 - Avoid breathing dust/ fume/ gas/ mist/ vapours/
spray.
P305 + P351 + P338 - IF IN EYES: Rinse cautiously
with water for several minutes. Remove

Supplemental Hazard Statements : contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing.
None

Restricted to professional users

Labelling according to Directive 67/548/EEC or 1999/45/EC

Hazard symbols :



R-phrases : R36/37/38 - Irritating to eyes, respiratory system and skin.
S-phrases : S26 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S36 - Wear suitable protective clothing.

Triton X

Labelling according to Regulation (EC) No. 1272/2008 [CLP]

Hazard pictograms (CLP) :



Signal word : Danger
Hazard statements (CLP) : H302 - Harmful if swallowed.
H318 - Causes serious eye damage.
H411 - Toxic to aquatic life with long lasting effects.
Precautionary statements (CLP) : P273 - Avoid release to the environment.
P280 - Wear protective gloves/ eye protection/ face protection.
P305 + P351 + P338 - IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove
Supplemental Hazard Statements : None

Labelling according to Directive 67/548/EEC or 1999/45/EC

Hazard symbols :



R-phrases : R22 - Harmful if swallowed.
R41 - Risk of serious damage to eyes.
R51/53 - Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.
S-phrases : S26 - In case of contact with eyes, rinse immediately with plenty of water and seek medical advice.
S39 - Wear eye/face protection.

S61 - Avoid release to the environment. Refer to special instructions/ Safety data sheets.

Caution - substance not yet tested completely.

3 Composition/information on ingredients

Mixtures

Chemical characterization

Reagent mixture. Liquid

Hazardous components

Name	Product identifier	% (v/v)	Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008	
4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol (Triton-X)	(CAS N°) 9002-93-1	1	Acute Tox. 4 Eye Irrit. 2 Aquatic Chronic 2	H302 H319 H411
Tris base	(CAS N°) 77-86-1 (EC N°) 201-064-4	<0.1	Skin Irrit. 2 Eye Irrit. 2 STOT SE 3	H315 H319 H335
Sodium chloride	(CAS N°) 7647-14-5 (EC N°) 231-598-3	<0.1	Eye Irrit. 2	H319

Further Information

Full text of R- and H-phrases: see section 16.

4 First aid measures

Description of first aid measures

General information

In case of accident or if you feel unwell, seek medical advice immediately (show safety data sheet if possible).

After inhalation

Remove patient to fresh air. If breathing is difficult, give oxygen. If breathing has stopped, give artificial respiration. Consult a physician.

After contact with skin

Wash affected areas with soap and water. Consult a physician if irritation persists.

After contact with eyes

Rinse with plenty of water for 15 to 20 minutes. Consult a physician.

After ingestion

Rinse mouth with water. Consult a physician.

Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

Treat symptomatically.

5 Firefighting measures

Extinguishing media

Suitable extinguishing media

Use water spray, alcohol-resistant foam, dry chemical or carbon dioxide.

Extinguishing media which must not be used for safety reasons

none/none

Special hazards arising from the substance or mixture

Carbon oxides

Advice for firefighters

In the event of fire, wear self-contained breathing apparatus. Wear suitable protective clothing.

Additional information

Collect contaminated fire extinguishing water separately. Do not allow entering drains or surface water.

6 Accidental release measures

Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Wear suitable protective equipment. Avoid breathing vapors, mist or gas. Ensure adequate ventilation. Evacuate the danger area.

Environmental precautions

Prevent further leakage. Keep away from drains, surface and ground water.

Methods and material for containment and cleaning up

Cover drains, dilute with water and use an absorbent material to clean up the accident place. Dispose as hazardous waste.

Reference to other sections

See protective measures under point 7 and 8.

7 Handling and storage

Precautions for safe handling

Advice on safe handling

Wear protective equipment while in use (Refer to chapter 8). Avoid contact with skin and eyes. Do not ingest. Do not eat, drink and smoke in the work areas. After use wash hands and removed protective equipment.

Advice on protection against fire and explosion

No special fire protection measures are necessary.

Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Requirements for storage rooms and vessels

Keep upright and tightly closed to prevent any leakage..

Advice on storage compatibility

Keep away from incompatible agents like strong acids, strong bases and strong oxidizing agents.

Further information on storage conditions

Keep/Store only in original container.

Store in a refrigerated zone. Recommended storage temperature: 2 - 8 °C..

8 Exposure controls/personal protection

Control parameters

Additional advice on limit values

No available data.

Exposure controls

Occupational exposure controls

Refer to chapter 7. No further action is necessary.

Protective and hygiene measures

Facilities should be equipped with an eyewash facility and a safety shower. Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

Respiratory protection

With correct and proper use, and under normal conditions, breathing protection is not required.

Hand protection

Wear gloves. Avoid product contact when removing gloves. Dispose in accordance with applicable laws.

Eye protection

Tightly fitting safety goggles approved under appropriated government safety standards.

Skin protection

Wear appropriate protective clothing to prevent skin exposure.

Environmental exposure controls

This material and its container must be disposed of in a safe way.

9 Physical and chemical properties

Information on basic physical and chemical properties

Appearance	: Liquid
Color	: Colorless
Odor	: Odorless
pH	: 10
Melting point/freezing point	: Not determined
Initial boiling point and boiling range	: Not determined
Flash point	: Not determined
Evaporation rate	: Not determined
Flammability	: Not determined
Upper/lower flammability limits	: Not determined
Vapor pressure	: Not determined
Vapor density	: Not determined
Relative density	: Not determined
Solubility	: Not determined
Partition coefficient: n-octanol/water	: Not determined
Auto-ignition temperature	: Not determined
Decomposition temperature	: Not determined
Viscosity	: Not determined

Explosive properties : Not determined

Oxidizing properties : Not determined

10 Stability and reactivity

Chemical stability

Stable under normal storage and handling conditions.

Possibility of hazardous reactions

No information available.

Conditions to avoid

No information available.

Incompatible materials

Incompatible material for Triton-X100.

Strong acids, Strong bases, Strong oxidizing agents.

11 Toxicological information

Information on toxicological effects

Acute toxicity

4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol (Triton-X)

LD50 Oral - rat : 707 mg/kg

LC50 Inhalation - rat : 500 mg/kg

LD50 dermal - rabbit : 8 000 mg/kg

Skin Irritation/corrosion : No data available.

Eye Irritation : Causes serious eye damage.

Skin Sensitization : No sensitization.

Genetic toxicity : No data available.

Carcinogenicity : No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.

Reproductive toxicity : No data available.

STOT - single exposure : No data available.

STOT - repeated exposure : No data available.

Aspiration hazard : No data available.

Sodium chloride

LD50 Oral - rat : 3,550 mg/kg

LC50 Inhalation - rat : 1 h - > 42,000 mg/m3

LD50 dermal - rabbit : 10,000 mg/kg

Skin Irritation/corrosion : No data available.

Eye Irritation : No data available.

Skin Sensitization : No data available..

Genetic toxicity : No data available.

Carcinogenicity : No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as

		probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	:	No data available.
STOT - single exposure	:	No data available.
STOT - repeated exposure	:	No data available.
Aspiration hazard	:	No data available.

Trizma base

LD50 Oral - rat	:	5,900 mg/kg
LC50 Inhalation - rat	:	No data available.
LD50 dermal - rabbit	:	No data available.
Skin Irritation/corrosion	:	No data available.
Eye Irritation	:	Eyes - rabbit - Mild eye irritation
Skin Sensitization	:	No data available..
Genetic toxicity	:	No data available.
Carcinogenicity	:	No component of this product presents at levels greater than or equal to 0.1% is identified as probable, possible or confirmed human carcinogen by IARC.
Reproductive toxicity	:	No data available.
STOT - single exposure	:	Inhalation - May cause respiratory irritation.
STOT - repeated exposure	:	No data available.
Aspiration hazard	:	No data available.

12 Ecological information

Toxicity

4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol (Triton-X): H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.

Persistence and degradability

4-(1,1,3,3-Tetramethylbutyl)phenyl-polyethylene glycol (Triton-X): H411 Toxic to aquatic life with long lasting effects.

Bioaccumulative potential

No data available.

Mobility in soil

No data available.

Results of PBT and vPvB assessment

Not data available.

13 Disposal considerations

Waste treatment methods

Advice on disposal

Waste disposal according to official state regulations. Consult the local waste disposal expert about waste disposal.

Waste disposal number of waste from residues/unused products

160506	WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
--------	--

Classified as hazardous waste.

Waste disposal number of used product

160506 WASTES NOT OTHERWISE SPECIFIED IN THE LIST; gases in pressure containers and discarded chemicals; laboratory chemicals, consisting of or containing dangerous substances, including mixtures of laboratory chemicals
Classified as hazardous waste.

Waste disposal number of contaminated packaging

150110 WASTE PACKAGING; ABSORBENTS, WIPING CLOTHS, FILTER MATERIALS AND PROTECTIVE CLOTHING NOT OTHERWISE SPECIFIED; packaging (including separately collected municipal packaging waste); packaging containing residues of or contaminated by dangerous substances
Classified as hazardous waste.

Contaminated packaging

Cleaned containers may be recycled.

14 Transport information

Land transport (ADR/RID)

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Inland waterways transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Marine transport

UN number

Not restricted

UN proper shipping name

Not restricted

Other applicable information (marine transport)

Air transport

Not restricted

Other applicable information (air transport)

Not restricted

15 Regulatory information

Safety, health and environmental regulations/legislation specific for the substance or mixture

National regulatory information

16 Other information

Changes

Full text of R-phrases referred to under sections 2 and 3

R22	Harmful if swallowed.
R36	Irritating to eyes.
R36/37/38	Irritating to eyes, respiratory system and skin.
R41	Risk of serious damage to eyes.
R51/53	Toxic to aquatic organisms, may cause long-term adverse effects in the aquatic environment.

Full text of H-Statements referred to under sections 2 and 3

H302	Harmful if swallowed.
H315	Causes skin irritation.
H319	Causes serious eye irritation.
H335	May cause respiratory irritation.
H411	Toxic to aquatic life with long lasting effects.

Anexo 6

Identificação produto
Product identification

Etanol 50%
Ethanol 50%

Parâmetro/Parameter	Resultado/Results	Especificação/ Specification
Etanol <i>Ethanol</i>		50%

Aprovado por/Approved by

Data/Date

Identificação produto
Product identification

Solução de Hibridação
PNA probe

Parâmetro/Parameter	Resultado/Results	Especificação/ Specification
PNA		4μM
Sulfato de dextrano Dextran sulfate		9.5% (W/V)
NaCl		9.5 mM
Formamida Formamide		28.5% (V/V)
Pirofosfato de sódio Sodium pyrophosphate		0,095% (W/V)
Polivinilpirrolidona Polyvinylpyrrolidone		0,19% (W/V)
Ficoll 400-DL		0,19% (W/V)
EDTA sal disódico Disodium EDTA		4.745 mM
Triton X-100		0,095% (V/V)
Tris-HCl		47.5 mM

Aprovado por/Approved by

Data/Date

Identificação produto
Product identification

Solução de Fixação 1
Fixation Solution 1

Parâmetro/Parameter	Resultado/Results	Especificação/ Specification
Paraformaldído 4% <i>Paraformaldehyde</i>		4%
NaCl		7.92g/L
KCl		198mg/L
Na ₂ PO ₄		640mg/L
KH ₂ PO ₄		198mg/L

Aprovado por/Approved by

Data/Date

Identificação produto
Product identification

Solução de Fixação 2
Fixation Solution 2

Parâmetro/Parameter	Resultado/Results	Especificação/ Specification
Etanol Ethanol		50%

Aprovado por/Approved by

Data/Date

Anexo 7

1. Solutions used in the protocol of Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) for 1 lot (60 kits)

1.1. Hybridization solution

The compounds required for the preparation of hybridization solution, as well as the concentrations and quantities for the preparation of 162 mL of solution, are shown in Table 1.

Table 1 – Composition hybridization solution. Concentrations and quantities for the preparation of 162 ml of solution.

Compounds and [] on solution	Quantities for 162 mL of solution.
10% (W/V) Dextran sulfate	16,2 g
10 mM NaCl	0,0940 g
30% (V/V) Formamide	48,6 mL
0,1% (W/V) Sodium pyrophosphate	0,162 g
0,2% (W/V) Polyvinylpyrrolone	0,320 g
0,2% (W/V) FICOLL	0,320 g
5 mM Disodium EDTA	0,320 g
0,1% (V/V) Triton X-100	0,162 mL
50 mM Tris-HCl	1,28 g

After dissolution of all reagents make the final volume with sterile (113,24mL) water and adjust pH to 7.5. The dextran sulfate is difficult to dissolve, however the pH adjustment helps the dissolution. Filter the solution through an acrodisc with a 0.2 μ m of porosity and syringe . Store the solution at 4°C, until it is used for the preparation of aliquots of use (solution required for step 3.3). .

1.2. Washing buffer

The washing buffer is prepared with the reagent presents in the table 2.

Table 2 – Composition of the washing buffer. Concentration of the different reagents and their respectives quantities for 3000 mL of solution.

Compounds and [] on solution	Quantities for 3000 mL of solution.
-------------------------------	-------------------------------------

5 mM Tris Base	109,08 g
15 mM NaCl	157,50 g
1 % (V/V) Triton-X	1800 mL

After dissolution of all reagents make the final volume with distilled water (1200mL) and adjust pH to 10. Autoclave the solution (121 ° C, 15 minutes), **cool quickly** and store at 4 ° C, until it is used for filling kit.

1.3. 4% Paraformaldehyde solution (paraformaldehyde fixative)

The preparation of 180 ml of Paraformaldehyde should be carried out as follows:

1. Heat 117 ml of distilled water at 60 ° C and add, in hotte, 7.2 g of paraformaldehyde;
2. Keeping the solution under stirring at thermal plate and add, dropwise, NaOH (2M) to clarify the solution which is whitish (should take only 1-2 min);
3. Remove from heat and add 59.4 mL of PBS 3X. Adjust pH to 7.2 with HCl (1 M);
4. Filter the solution through an acrodisc with a 0.2 µm of porosity and syringe. Cool rapidly up to 4°C and store in a refrigerator or in ice, until it is used for filling kit.

1.3.1. 3xPBS solution (Phosphate Buffered Saline)

The 3xPBS solution is prepared with the reagent presents in the table 3.

Table 3- Reagents required for the production of 3 xPBS solution

Compounds and [] on solution	Quantities for 59,40 mL of solution.
180 mM NaCl	1,426g
3 mM KCl	0,03556 g
9 mM Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	0,1443 g
1,5 mM KH ₂ PO ₄	0,03556 g

After dissolution of all reagents make the final volume with distilled water (59,40 mL) and autoclave the solution (121 ° C, 15 minutes), until it is used for the preparation of Paraformaldehyde solution (solution required for step 1.3)

2. Solution used to prepare the original aliquot of the probe (1% TFA and 10% ACN)

Preparation of 0.720 ml solution containing 1% TFA (trifluoroacetic acid) and 10% ACN (acetonitrile) should be carried out as follows:

1. Add 0.072 ml ACN at 0.578 ml of ultrapure water. The ACN can be handled without recourse to the hotte, but does not replace the use of the mask or the flow chamber;
2. In the hotte, add to the above solution 0.0072 ml TFA and make up to final volume with ultrapure water;
3. Filter the solution through an acrodisc with a 0.2 µm of porosity and syringe. Store the solution at 4°C.

3. Probe's aliquots preparation

The probe comes in powder form and soon after its receipt must be stored in the freezer at -20 ° C. The kit has two types of probe4Salmonella original aliquot. All procedures described below for the preparation of aliquots of probe should be performed in the dark as well as any other step involving the handling of the probe.

3.1. Original aliquot

The original aliquot containing reactants present in Table 4, it must be stored in a freezer at -20 ° C wrapped in aluminium paper, until it is used for the preparation of stock aliquots

Table 4- Reagents required for preparation of original aliquot

Compounds	Quantities for 0,360 L of solution.
Probe	174,24µg
Solution of 1% TFA e 10% ACN	0,360 mL

3.2. Stock aliquots

Prepare aliquots of 4 μM for stock by adding 360 μl of the probe solution of 100 μM to 8.64 ml of ultrapure water. Aliquots stock should also be stored in the freezer at -20°C wrapped in aluminum paper, until it is used for the preparation of use aliquots.

3.3. Use aliquot

Prepare to use aliquots of 200 nM in the hybridization solution. To this, add 9 ml aliquot of each stock to 162 ml of hybridization solution. The aliquot for use should be stored in a refrigerator at 4°C , until it is used for filling kit.

After filling the kits, they must be stored at 4°C in refrigerator.

Anexo 8

 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____
 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____
 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____
 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____
 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____
 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____
 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____	 BIOMOLECULAR DETERMINATION Código EQUIPAMENTO _____

Anexo 9

